

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



**“ESCHERICHIA COLI” PRODUCTORES DE BLEE
AISLADOS DE UROCULTIVO: IMPLICACIONES
EN EL DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA
INFECCIÓN URINARIA.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Elena Hernández Álvarez

Bajo la dirección de la doctora

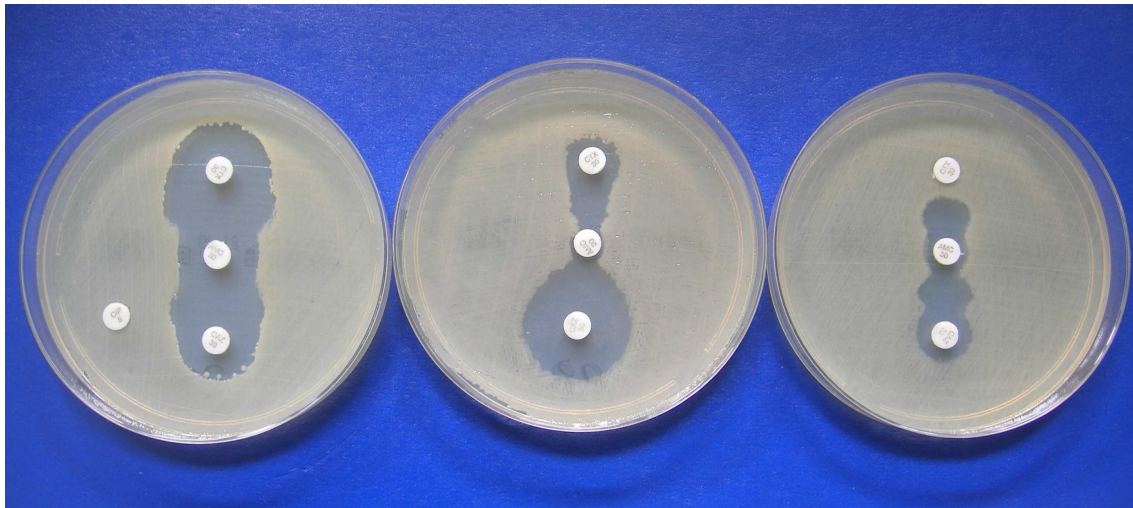
Carmen Rodríguez-Avial

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-2390-8



**Universidad Complutense de
Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología I**



**Tesis Doctoral
Elena Hernández Álvarez
Madrid, Abril 2009**

**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología I**



***Escherichia coli* productores de BLEE aislados
de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y
tratamiento de la infección urinaria.**

**Tesis Doctoral
Elena Hernández Álvarez
Madrid, Abril 2009**

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de esta tesis, especialmente al grupo de trabajo tan maravilloso con el que he tenido la suerte de trabajar formado por la Dra. Carmen Rodríguez-Avial, Dra. Iciar Rodríguez-Avial y la Dra. Esther Culebras.

A la profesora **Carmen Rodríguez-Avial**, por la confianza que deposito en mí, dándome la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección. Por la profesionalidad y dedicación con la que ha dirigido este trabajo y por el gran apoyo que me ha demostrado en todo momento.

Al Dr. Juan J. Picazo por la confianza que deposito en mí al dejarme trabajar en su servicio y por haberme facilitado para mi trabajo toda la infraestructura y material del servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

A la Dra. **Iciar Rodríguez-Avial** y a la Dra. **Esther Culebras** por su apoyo y guía en la codirección de esta tesis.

A la Dra. **Olga López Bartolomé** y a todo el personal del servicio de microbiología del Hospital Clínico San Carlos por prestarme en algún momento su ayuda, conocimiento y experiencia.

A la Dra. **Mercedes Herranz** por haber sido el primer eslabón del comienzo de esta tesis.

A mi marido **Miguel** y a mis hijos **Jorge, Pablo y Marta** por lo entrañables y cariñosos que son conmigo.

A mi **Madre** por la ilusión que manifiesta frente a todo lo que hago.

Abreviaturas

- BLEE: betalactamasa de espectro extendido.
- CMI: Concentración mínima inhibitoria.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute (antes the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)).
- BSAC: British Society for Antimicrobial Chemoterapy
- SFM : *Société Française de Microbiologie*
- RAPD: Randomly amplified polymorphic DNA.
- ERIC-2: Enterobacterial repeat intergenic consensos.
- PCR: Polymerase Chain reaction.
- SENTRY: Antimicrobial Surveillance Program
- MYSTIC: Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
- SMART: Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends

Índice

Introducción	5
1. <i>Escherichia coli</i> y las infecciones del tracto urinario.	5
1.1. Familia Enterobacteriaceae: estructura y factores de virulencia de <i>E.coli</i> .	5
1.2. Infecciones del tracto urinario.	8
2. Antibióticos betalactámicos.	14
2.1. Mecanismo de acción.	15
2.2. Clasificación y estructura química.	15
2.3. Espectro antibacteriano.	18
2.4. Mecanismos de resistencia bacteriana.	19
3. Betalactamasas.	22
3.1. Generalidades.	22
3.2. Clasificación de las betalactamasas.	22
3.2.1. Antecedentes históricos.	23
3.2.2. Clasificación molecular de Ambler.	23
3.2.3. Clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros.	26
3.3. Producción de betalactamasas.	31
3.3.1. Betalactamasas cromosómicas.	31
3.3.2. Betalactamasas plasmídicas.	32
3.3.2.1. Betalactamasas de amplio espectro.	32
3.3.2.2. IRT.	34
3.3.2.3. Cefamicinasas plasmídicas de clase C.	35
3.3.2.4. Carbapenemasas.	37
3.4. Betalactamasas de espectro extendido.	38
3.4.1. BLEE tipo TEM.	40
3.4.2. BLEE tipo SHV.	43
3.4.3. BLEE tipo CTX-M.	47
3.4.4. BLEE tipo OXA.	49

3.4.5.	BLEE tipo PER, VEB-1, BES-1 y otras BLEE.	50
3.5.	Epidemiología de las BLEE.	51
3.5.1.	Epidemiología global.	52
3.5.2.	Infecciones nosocomiales.	55
3.5.3.	Infecciones adquiridas en la comunidad.	57
3.5.4.	Factores de riesgo implicados en la colonización e infección por organismos productores de BLEE.	57
3.5.5.	Medidas de control de la aparición y diseminación de la infección por BLEE.	58
3.6.	Detección en el laboratorio.	59
3.7.	Resistencias asociadas.	61
	Objetivos	66
	Material y métodos	68
1.	Aislados clínicos.	68
2.	Métodos de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.	68
2.1.	Método de dilución en agar.	68
2.2.	Método de Épsilon-test.	71
3.	Pruebas fenotípicas de confirmación de BLEE.	72
3.1.	Test de sinergia de doble disco.	72
3.2.	Prueba confirmatoria para BLEE del CLSI.	73
4.	Determinación del punto isoeléctrico.	73
4.1.	Obtención del extracto crudo enzimático.	73
4.2.	Isoelectroenfoque	74
5.	Estudios genéticos.	76
5.1.	Extracción de DNA.	76
5.2.	Calculo de la concentración de DNA.	76
5.3.	Amplificación de los genes que codifican para BLEE.	76
5.4.	Amplificación de los genes de resistencia a quinolonas.	78
5.5.	Detección de los amplificados por electroforesis en geles de agarosa.	80

5.6.	Secuenciación de los productos de PCR.	80
6.	Análisis epidemiológico de las cepas mediante (RAPD).	81
7.	Calculo estadístico.	82
	Resultados	83
1.	Aislados clínicos.	83
2.	Pruebas fenotípicas de confirmación de BLEE.	83
2.1.	Test de sinergia de doble disco.	83
2.2.	Prueba confirmatoria para BLEE del CLSI.	85
3.	Sensibilidad a los antimicrobianos betalactámicos.	89
4.	Punto iso eléctrico.	94
5.	Caracterización de las BLEE.	99
5.1.	Distribución de las CMI's obtenidas para cada tipo de BLEE.	103
5.2.	Combinaciones de BLEE: Distribución de las CMI's obtenidas.	109
5.3.	Distribución de las CMI's de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima indicando el tipo de BLEE.	112
5.4.	Distribución de las CMI's de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima en las cepas productoras de BLEE tipo TEM, SHV y CTX-M y sus combinaciones dentro del conjunto total de valores de CMI.	114
6.	Resistencias asociadas.	121
6.1.	Sensibilidad a los antimicrobianos no betalactámicos.	121
6.2.	Distribución según el tipo de BLEE.	123
6.3.	Comparación de resistencias con un grupo control.	127
7.	Caracterización de la resistencia a quinolonas.	129
8.	Secuenciación.	130
9.	Epidemiología de las cepas.	132
9.1.	Distribución de las cepas en función de su procedencia	132
9.2.	Distribución de los pacientes en función de la edad	133
9.3.	Distribución de los aislamientos en función de la fecha	134

9.4. Distribución de los tipos de BLEE según procedan de la comunidad o del hospital	135
9.5. Análisis del genotipado por RAPD	137
Discusión	140
Conclusiones	156
Referencias bibliográficas	159
Addendum	172

Introducción

1. *Escherichia coli* y las infecciones del tracto urinario

1.1. La familia Enterobacteriaceae: estructura y factores de virulencia de *E. coli*

La familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram-negativos de gran importancia en la patología infecciosa, estando implicados en diferentes síndromes clínicos. Es el grupo de microorganismos que más frecuentemente se aísla en los laboratorios clínicos de microbiología, produciendo infecciones tanto en pacientes con inmunidad conservada como en inmunodeprimidos y son causantes de diferentes tipos de infecciones tanto de adquisición en la comunidad como nosocomiales (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005) (Hernández, Pascual et al. 2003).

Figura 1: Microfotografía de bacilos gram-negativos.



Fuente: www.artigosbrasil.com.br

Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota intestinal, pero además, en pacientes alcohólicos, diabéticos o ingresados en un hospital se pueden aislar de la cavidad oral y faringe (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005)

E. coli es la enterobacteria más importante ya que es la que se halla con más

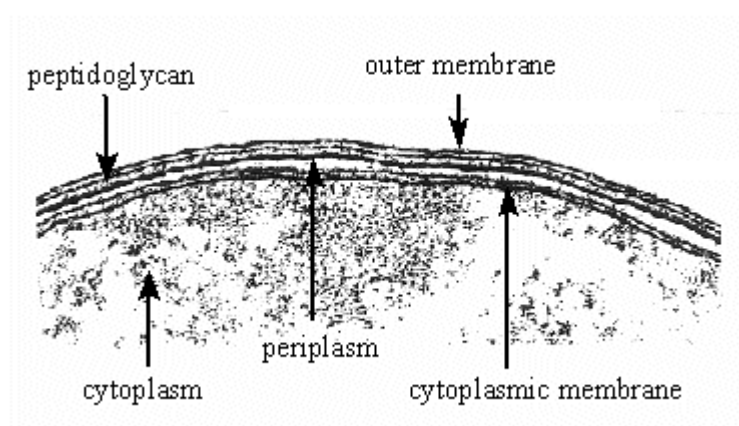
frecuencia en el tracto digestivo y la más descrita como causa de patología en los seres humanos. Se trata de un enterobacteria móvil, catalasa positiva, oxidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito, normalmente fermenta la lactosa, produce indol a partir del triptófano siendo negativa la reacción de Voges-Proskauer, ureasa y fenilalanina desaminasa (Mandell, Bennett et al. 2005).

Estructura

La cubierta celular de las enterobacterias, al ser gram-negativas, es del tipo didermo y esta constituida por (Figura 2):

- Membrana citoplasmática externa, formada por una capa de fosfolípidos con proteínas intercaladas
- Sobre ésta se sitúa una capa fina de peptidoglicano y entre ambas se encuentra el espacio o gel periplásmico, también llamado por algunos autores periplasma.
- Por encima se sitúa la membrana externa constituida por una bicapa de fosfolípidos intercalada con distintos componentes como el lipopolisacárido (LPS), lipoproteínas y porinas.
- Además en el caso específico de las enterobacterias, aparecen componentes como flagelos, fimbrias o pili y las adhesinas no fimbrias (Mandell, Bennett et al. 2005)

Figura 2.: Estructura de la cubierta celular de bacterias gram-negativas.

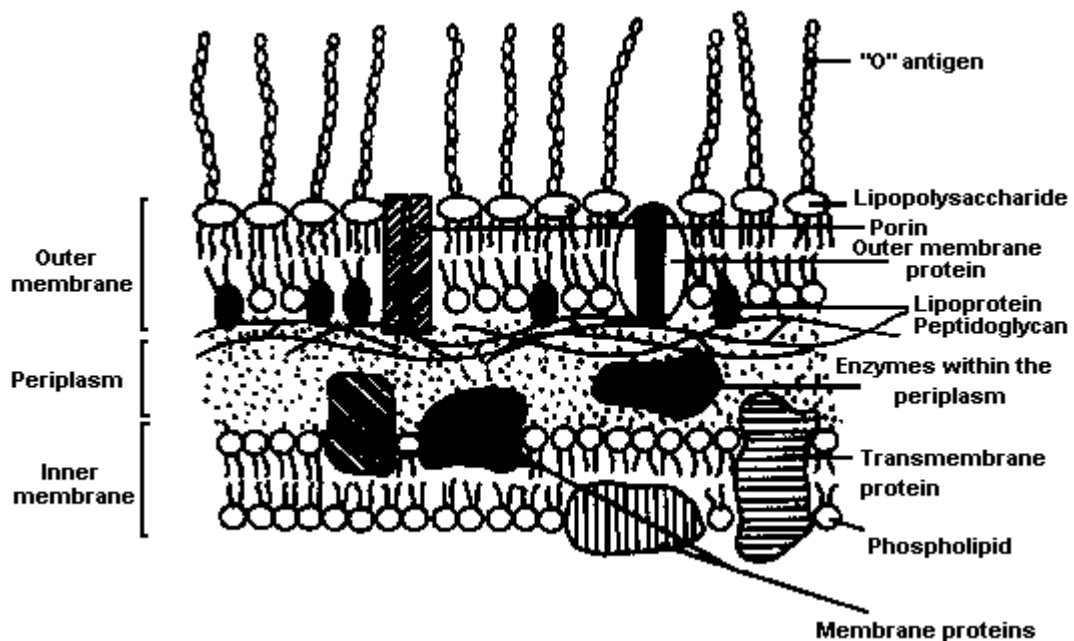


Fuente: www.conacyt.mx

La estructura antigénica está formada por tres clases de antígenos (Fig.3)

- Antígenos somáticos o antígenos O son cadenas de polisacárido procedente del LPS capsular que están presentes en todas las bacterias gramnegativas; es el que le confiere especificidad serológica.
- Antígenos flagelares o antígenos H son proteínas que se localizan en los flagelos.
- Capsulares o antígenos K presentes en cepas con cápsula, constituyen una barrera defensiva disminuyendo la capacidad de los anticuerpos para unirse a la bacteria, son un factor de virulencia fundamental porque impide la fagocitosis.

Figura 3.: Estructura antigénica de bacterias gramnegativas



Fuente: www.losmicrobios.com.ar

Factores de virulencia:

Son todas las estructuras o productos bacterianos que intervienen en el proceso infeccioso. Las enterobacterias poseen una serie de factores de virulencia implicados en la producción de los diferentes síndromes clínicos, por una parte

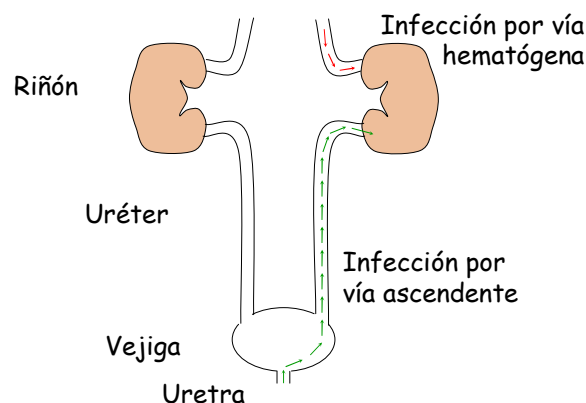
poseen fimbrias y adhesinas imprescindibles para adherirse a las mucosas, siendo este el primer paso para la colonización bacteriana, por otra parte producen toxinas como la endotoxina o lipopolisacárido de la pared y otras: hemolisina, citotoxinas y por ultimo poseen plásmidos que son unidades de ADN extracromosómicos, intracitoplasmáticos, con capacidad de autorreplicación y que juegan un papel fundamental en la codificación de información para su acción patógena (islas de patogenicidad) así como para la resistencia a los antibióticos (Mandell, Bennett et al. 2005)

1.2. Infecciones del tracto urinario

Entendemos por infección la entrada, establecimiento y multiplicación de microorganismos en el interior o en la superficie de un huésped, existiendo distintos grados de relación entre el huésped y el microorganismo: colonización, infección inaparente y enfermedad infecciosa. (Andréu, Alos et al. 2005)

La infección del tracto urinario (ITU) se caracteriza por la presencia de microorganismos en el tracto urinario a cualquier nivel, desde el extremo distal de la uretra hasta el cortes renal (uretra, vejiga, próstata, uréteres, pelvis renal o riñones), englobando diferentes entidades clínicas que requieren su catalogación mediante la correlación clínica-laboratorio.

Figura 4.: Esquema de las vías de acceso de la infección al riñón



Fuente: Dra Rodriguez-Avial, C

E. coli accede al sistema genitourinario a través del periné desde el tubo digestivo, fundamentalmente en las mujeres por presentar una uretra más corta. La vía urinaria es el origen de la mayoría de las bacteriemias y su posterior diseminación a otros tejidos.

El término infección urinaria incluye distintos síndromes como pielonefritis aguda y crónica, cistitis y síndrome uretral agudo, los cuales afectan a diversas estructuras de las vías urinarias, presentando diferencias en relación a la clínica y gravedad del cuadro que producen.

Las infecciones del tracto urinario son, dentro de las infecciones bacterianas, de las más frecuentes en el hombre, siendo los bacilos gram- negativos el grupo taxonómico más frecuentemente aislado, predominando *Escherichia coli* como agente causal. De hecho, la infección de las vías genitourinarias ocupa el segundo lugar en frecuencia, después de las infecciones del aparato respiratorio. Esta incidencia junto a su morbilidad (pielonefritis crónica, insuficiencia renal) y mortalidad (foco de bacteriemia y sepsis), representan un importante reto a la hora de establecer su diagnóstico y tratamiento.

Las infecciones del tracto urinario son de gran importancia por su prevalencia. Aproximadamente el 20% de las mujeres desarrollan una infección urinaria a lo largo de su vida; es la infección nosocomial más frecuente en España y ocupa el segundo lugar de las infecciones atendidas por equipos de Atención Primaria.

Más del 95% de las ITU son monobacterianas. Siendo *E. coli* el microorganismo más frecuentemente implicado en la infección aguda y en infecciones producidas en pacientes ambulatorios. Sin embargo en el caso de infecciones recurrentes, especialmente en presencia de anormalidades estructurales del aparato urinario, como son anomalías congénitas, vejiga neurogénica y obstrucciones del aparato urinario, las especies implicadas son *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, y *Enterobacter* seguido de *Enterococos* y *Staphylococos*. En este último caso son más frecuente las infecciones polimicrobianas y los microorganismos suelen ser más resistentes debido a que estos pacientes suelen ser tratados con varios ciclos

de antibiótico. Asimismo, estas especies son más frecuentes en el ambiente hospitalario. Otros agentes implicados en las ITU son *Corynebacterium urealyticum*, que ha sido reconocido como un importante patógeno nosocomial, microorganismos anaerobios, levaduras del género *Cándida* y *Staphylococcus saprophyticus* que se asocia a ITU en mujeres jóvenes sexualmente activas. También se ha implicado en ITU a los géneros *Gardnerella*, *Ureaplasma* y *Mycoplasma*. Por último asociadas a cálculo renales, aparecen infecciones producidas por nanobacterias. (Mandell, JE et al. 2005)

La distribución epidemiológica no es uniforme, variando su incidencia en función de la edad y el sexo. En lactantes menores de 3 meses predomina en varones y posteriormente es más frecuente en niñas. En la edad adulta, existe una mayor prevalencia en la mujer coincidiendo con el inicio de las relaciones sexuales. En la vejez la incidencia de ITU aumenta en ambos sexos, aunque de manera más marcada en varones. (Mandell, JE et al. 2005)

Para realizar un diagnóstico correcto se debe recurrir al análisis microbiológico, ya que los signos y síntomas que pueden aparecer acompañando a la infección del tracto urinario no poseen la suficiente especificidad.

Las infecciones del tracto urinario se dividen en infecciones de vías altas y bajas. Describiéndose cuatro síndromes principalmente: uretritis, cistitis, prostatitis y pielonefritis

En las infecciones urinarias de vías bajas, se incluyen:

1. La cistitis, infección superficial de la mucosa vesical, caracterizada por la presencia del síndrome miccional: disuria (escozor), polaquiuria (aumento de la frecuencia, aunque no del volumen total) y tenesmo (micción urgente), a menudo acompañados de dolor suprapúbico, orina maloliente y en ocasiones puede aparecer hematuria.
2. La uretritis, inflamación de la uretra, generalmente causada por infecciones de transmisión sexual.
3. La prostatitis, inflamación de la próstata, aguda o crónica

4. La epididimitis, inflamación del epidídimo, generalmente secundaria a prostatitis.
5. En las infecciones urinarias de vías altas, se incluyen los síndromes debidos a inflamación del parénquima renal (pielonefritis aguda o crónica) y los procesos supurativos locales (absceso renal). La presencia de fiebre, dolor lumbar o puño percusión positiva indican infección del riñón.

Una clasificación de las ITU de gran utilidad desde el punto de vista clínico es la que distingue entre complicadas y no complicadas:

Las infecciones urinarias complicadas son las que se producen en pacientes con patología metabólica previa o con anomalía estructural o funcional del tracto urinario (la presencia de cálculos, obstrucción, anomalías anatómicas, vejiga neurógena o cuerpo extraño), el embarazo, la diabetes, el trasplante renal, la edad avanzada, la hospitalización, la hipertrofia prostática y diversas enfermedades metabólicas e inmunológicas también pueden hacer complicada una ITU. También se incluyen aquí las causadas por patógenos resistentes a antibióticos. (Mensa 2008). Según opiniones, la única infección urinaria no complicada es la cistitis en la mujer sana no embarazada.

Por último, cuando se producen de forma recurrente se pueden clasificar en recidivas y reinfecciones.

Las recidivas representan el 20% de las recurrencias, la bacteriuria es debida al mismo germen que produjo la primera infección, y suele ocurrir entre una y dos semanas después de finalizar el tratamiento previo. Pueden ser debidas a la persistencia del microorganismo en el tracto urinario, a un tratamiento antibiótico inadecuado o demasiado corto, a la existencia de una anomalía genitourinaria o al acantonamiento de los gérmenes en un lugar inaccesible al antibiótico.

Las re infecciones, son más frecuentes que las recidivas, están producidas por una bacteria distinta y se producen meses después de la infección inicial. A veces pueden deberse al mismo microorganismo, que persiste en vagina o intestino.

En el diagnóstico de las ITU, hay que tener en cuenta cinco puntos fundamentales:

1. Diagnóstico clínico.
2. Diagnóstico de localización.
3. Valoración de la función renal.
4. Existencia o no de factores predisponentes a ITU (gestación, patología prostática, prolapso vesical, alteración del pH vaginal, manipulación e instrumentalización de la vía urinaria, hipertensión, diabetes).
5. Diagnóstico etiológico (aislamiento de uropatógeno)

El método de referencia para el diagnóstico etiológico de las infecciones del tracto urinario sigue siendo el cultivo cuantitativo de orina completado con el estudio del sedimento; de tal manera que el urocultivo es una prueba imprescindible para establecer el diagnóstico y tratamiento de una infección urinaria, pues permite aislar e identificar al agente causal de la misma y determinar la sensibilidad a los antimicrobianos.

Los criterios más revelantes en la elección de un antibiótico para el **tratamiento de las ITUs**, que sea fácil para el cumplimiento terapéutico y que presente una eliminación urinaria elevada y mantenida (Andréu, Alos et al. 2005)

Otros aspectos a tener en cuenta son:

- elevada tolerabilidad y mínima toxicidad.
- tasa de resistencias bacterianas bajas (<10% para primera elección en tratamiento empírico).
- Activo frente a los uropatógenos habituales
- De espectro reducido, con el fin de no seleccionar resistencias
- Con eficacia demostrada en ensayos clínicos (no sólo in vitro).
- Con buena relación Costo-efectividad (eficiencia).
- Biodisponibilidad elevada
- Administración en pauta corta o en dosis única.
- Vía de administración parenteral/oral.

- Mecanismo de acción bactericida.
- De escasa biotransformación.

En las tablas 1 y 2 se relacionan los antibióticos que suelen considerarse como opciones de tratamiento según el tipo de ITU: (Mandell, JE et al. 2005) (Mensa 2008)

Tabla 1.: En las infecciones de la vía urinaria superior.

<p>Pielonefritis aguda sin criterios de ingreso hospitalario</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cefalosporina 3^a oral o im • Aminoglucósido im (dosis única diaria) • Fluoroquinolonas.
<p>Pielonefritis aguda con criterios de ingreso hospitalario:</p> <p>a. Sin riesgo de infección por microorganismos resistentes y con estabilidad hemodinámica</p> <p>b. con riesgo de infección por microorganismos resistentes y/o inestabilidad hemodinámica</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cefalosporina 3^a, aztreonam, ertapenem • Aminoglucósido im o iv (dosis única diaria) • Carbapenemem (imipenem o meropenem) • Piperacilina/tazobactam • En caso de shock añadir un amino glucósido a cualquiera de las pautas mencionadas.

Tabla 2.: En las infecciones de la vía urinaria inferior.

Cistitis no complicada	<ul style="list-style-type: none"> • Cefalosporinas de 2ª o 3ª generación (3-5 días). • Fluoroquinolonas (3-5 días). • Amoxicilina/clavulánico (5 días). • Fosfomicina trometamol (Dosis única). • Nitrofurantoína (7 días).
Cistitis complicada	<ul style="list-style-type: none"> • Cefalosporinas de 2ª o 3ª generación (7 días).
Recidivas en el varón	<ul style="list-style-type: none"> • Fluoroquinolonas. • Trimetoprim-sulfametoxazol
Reinfecciones en la mujer posmenopáusica.	<ul style="list-style-type: none"> • Profilaxis con dosis bajas de antibiótico o aplicación de cremas vaginales con estrógenos. • Si la recurrencia es sintomática y presenta relación con anomalía urológica que no se puede corregir se aconseja profilaxis antibiótica durante 6-12 meses. Fluoroquinolonas, Trimetoprim-sulfametoxazol, Nitrofurantoína.
Bacteriuria asintomático en embarazadas	<ul style="list-style-type: none"> • Amoxicilina/clavulánico. • Cefalosporinas de 1ª generación. • Nitrofurantoína. • Fosfomicina.
Profilaxis antibiótica en embarazadas.	<ul style="list-style-type: none"> • Cefalexina. • Nitrofurantoína.

2. Antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos constituyen el principal grupo de antibióticos y el más utilizado para el tratamiento de las infecciones humanas. En 1928 Fleming observó el efecto inhibitor del *Penicillium*, un hongo filamentoso, sobre el crecimiento de bacterias en una placa de cultivo, pero fue en la década de los 40 cuando se consigue la producción industrial de la penicilina gracias a los estudios de

Florey y Chain. (Joklik 1996)

Estos antibióticos presentan como estructura básica el anillo betalactámico, formado por la condensación de alanina y beta-dimetilcisteína.

2.1. Mecanismo de acción

Los antibióticos betalactámicos tienen acción bactericida, actúan impidiendo la síntesis de la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, que es el componente que confiere estabilidad y rigidez a la bacteria, protegiéndola de la rotura osmótica.

Estos antibióticos se unen a lo que se denomina genéricamente como proteínas ligadoras de penicilinas (PBP), cuya función es catalizar una serie de reacciones de transpeptidación y carboxipeptidación necesarias para la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana.

Los betalactámicos actúan también activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. (Marín and Gudíol 2003)

2.2. Clasificación y estructura química

Esta familia de antibióticos viene definida químicamente por la presencia de un anillo betalactámico, originándose cinco grandes grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactames e inhibidores de las betalactamasas. (Marín and Gudíol 2003)

2.2.1. Estructura química de las Penicilinas

Las penicilinas contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, el cual deriva de la condensación entre una molécula de valina y una de cisteína, dando lugar al doble anillo característico. Presentan una cadena lateral en la posición 6, que varía de unas penicilinas a otras y es la que define sus propiedades.

Según el espectro de acción las penicilinas se pueden dividir en cinco subgrupos:

- Las penicilinas de primera generación presentan actividad frente a bacterias gram-positivas no productoras de betalactamasas, bacterias anaerobias y algunos cocos gram-negativos (como el meningococo)
- Las penicilinas semisintéticas resistentes a penicilasas son el tratamiento de elección para las infecciones debidas a bacterias del género *Staphylococcus*.
- El espectro de acción de las aminopenicilinas es más amplio que el de las penicilinas de primera generación, actuando además frente a cocos gramnegativos, enterobacterias no productoras de betalactamasas y enterococos.
- Por último, las ureidopenicilinas y las carboxipenicilinas presentan buena actividad frente a bacilos gram-negativos aerobios incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2.2. Estructura química de las Cefalosporinas

La estructura de las cefalosporinas se origina de la unión de un anillo dihidrotiacínico y un anillo betalactámico; al igual que con las penicilinas, las modificaciones en la cadena lateral dan lugar a las diversas cefalosporinas.

Las cefalosporinas se clasifican según su orden cronológico de aparición en cuatro generaciones:

- Las de primera generación son las más activas frente a estafilococos no productores de betalactamasas, como por ejemplo: cefalotina, cefazolina, cefaclor.
- Las de segunda generación amplían su espectro frente a bacterias gram-negativas de origen comunitario, como por ejemplo la cefuroxima, cefamandol y junto a ellas las cefamicinas como cefoxitina y cefminox más activas frente a los *Bacteroides del grupo fragilis*.

- Las de tercera generación son más activas frente a bacterias gram-negativas de adquisición nosocomial, como por ejemplo: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona.
- Las de cuarta generación presentan buena actividad frente a bacterias gram-positivas, gram-negativas y *Pseudomonas*, como por ejemplo: Cefepima.

2.2.3. Estructura química de los carbapenemes

Su estructura básica consiste en la unión de un anillo betalactámico con un anillo pirrolidínico compartiendo un nitrógeno.

Los carbapenemes son muy estables frente a betalactamasas de manera que dentro de los antibióticos betalactámicos son lo que presentan el espectro más amplio. Los representantes de este grupo son imipenem, meropenem y ertapenem siendo activos frente a bacterias gram-positivas, gram-negativas y anaerobias.

Imipenem es más activo frente a bacterias gram-positivas, mientras que ertapenem y meropenem presentan mayor actividad frente a bacterias gram-negativa aerobia.

Cabe destacar la falta de actividad de ertapenem frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2.4. Estructura química de los monobactames

Los monobactámicos contienen solo el anillo betalactámico.

Aztreonam es el único representante de este grupo, siendo activo frente a bacterias gram-negativas aerobias, incluyendo a *Pseudomonas aeruginosa* pero no frente a bacterias gram-positivas ni anaerobios.

2.2.5. Estructura química de los inhibidores de las betalactamasas

Dentro de los inhibidores de las betalactamasas con una estructura

betalactámica se encuentran el sulbactam, el ácido clavulánico y el tazobactam. El sulbactam es una sulfona semisintética del ácido penicilánico. El tazobactam posee un grupo triazol en posición 3. El ácido clavulánico tiene un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas pero se sustituye el átomo de azufre por uno de oxígeno y carece de la cadena lateral acilamino en posición 6.

2.3. Espectro antibacteriano

Los betalactámicos son activos frente a bacterias gram-positivas, gram-negativas y espiroquetas.

El espectro antimicrobiano de la penicilina *G* va desde los cocos gram-positivos y gram-negativos hasta bacilos gram-positivos, tanto facultativos como anaerobios, y algunos bacilos gram-negativos. La obtención de derivados semisintéticos del ácido 6-aminopenicilánico permitió disponer de preparados activos por vía oral, los cuales presentan mayor resistencia a las betalactamasas y mayor acción sobre bacterias gram-negativas (aminopenicilinas, penicilinas anti-pseudomonas y penicilinas antiestafilocócicas). (Marín and Gudiol 2003)

Mientras que las cefalosporinas de primera generación son muy activas frente a los cocos gram-positivos, las sucesivas generaciones son más activas frente a los bacilos gram-negativos.

Los carbapenémicos son dentro de los betalactámicos los que presentan mayor espectro.

El aztreonam posee una muy buena actividad frente a bacterias gram-negativas aerobias y facultativas, pero carece de actividad frente a gram-positivos y anaerobios.

Por último, los inhibidores de las betalactamasas, presentan una elevada afinidad frente a las betalactamasas a las que se unen de manera irreversible protegiendo de esta manera a los betalactámicos de su acción. Aisladamente poseen poca actividad antibacteriana, se utilizan asociados a otro betalactámico, siendo su función fundamental permitir a éste recuperar su actividad sobre

microorganismos que se han hecho resistentes por producción de betalactamasas. (Marín and Gudiol 2003)

2.4. Mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias a lo largo del tiempo han producido una amplia variedad de mecanismos de resistencia, con el fin de contrarrestar el efecto de los antibióticos. La eficacia de los antibióticos betalactámicos esta en continuo reto debido a la emergencia de cepas bacterianas resistentes. (Frere 1995)

Entendemos por resistencia bacteriana la condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico. (Bush, Jacoby et al. 1995). La resistencia puede estar mediada por genes cromosómicos o material extracromosómico (DNA plasmídico).

La resistencia cromosómica aparece por mutación, por el contrario los plásmidos y transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias. La transferencia de este material genético se realiza a través de diversos mecanismos como son la transformación, conjugación y transducción. (Marín and Gudiol 2003)

La resistencia de los bacilos gram-negativos a los antibióticos betalactámicos puede ser debida a varios mecanismos, que en ocasiones se asocian:

1. Alteraciones de la permeabilidad:

La membrana externa en las bacterias gram-negativas dificulta el paso de sustancias hidrofílicas, como los antibióticos β -lactámicos, los cuales necesitan los poros proteicos (porinas) para tal fin. Generalmente por mutaciones que afectan a las porinas, se produce una disminución de la concentración del antibiótico en el interior de la célula. (Marín and Gudiol 2003)

2. Producción de enzimas:

Hidrólisis del antibiótico por las betalactamasas, la producción de betalactamasas es el mecanismo de resistencia más importante frente a los antibióticos betalactámicos. (Cantón, Novais et al. 2008) Son enzimas de naturaleza proteica cuya síntesis está controlada por un gen, bien cromosómico o bien transferido por plásmidos.

Las betalactamasas se unen al grupo carboxilo y rompen el enlace amídico del anillo betalactámico lo cual hace que se pierda la capacidad de unión a las PBP. En las bacterias gram-negativas estas enzimas se encuentran en el espacio periplásmico y atacan al antibiótico antes de que este alcance su receptor. (Gupta 2007) Su producción puede ser constitutiva (se producen siempre) o inducible (sólo en presencia de un betalactámico). (Bush 1988) La producción de betalactamasas cromosómicas puede ser constitutiva (se producen siempre) o inducible (se producen sólo en presencia de un betalactámico). Las betalactamasas plasmídicas en los bacilos gram-negativos son constitutivas y su grado de producción esta en relación con el número de copias del plásmido. (Marín and Gudiol 2003)

Las modificaciones en la estructura de la enzima por sustitución de aminoácidos presenta una fuerte correlación con cambios en su función; (Du Bois, Marriott et al. 1995) asimismo, estudios cristalográficos demuestran que la estructura de algunas betalactamasas presenta una gran similitud con las PBP. (Frere 1995)

3. Alteraciones en el lugar de acción

Como los betalactámicos deben unirse a las PBP para ejercer su acción cualquier alteración a este nivel reduce la afinidad del antibiótico por su diana.

4. Expresión de bombas de eliminación activa:

Son bombas de flujo que bombean al antimicrobiano al exterior.

Como ya hemos comentado, el mecanismo de resistencia más frecuente es la producción de betalactamasas tanto de codificación cromosómica como plasmídica.

Este problema, en un principio, fue solventado clínicamente por la introducción de nuevos betalactámicos con cadenas laterales que protegiesen el anillo betalactámico: cefamicinas, cefalosporinas de tercera generación y monobactames

por la utilización de combinaciones de los betalactámicos existentes con los nuevos inhibidores de betalactamasas.

Pero las bacterias rápidamente adquirieron resistencia a estos antibióticos por los siguientes mecanismos:

- Algunas especies por hiperproducción de enzimas, cefalosporinasas inducibles de clase C, que además, pueden dar lugar a mutantes con desrepresión estable de su síntesis.
- Hiperproducción de betalactamasas clásicas.
- Aparición de nuevas betalactamasas, codificadas por plásmidos, mutantes de las tipo TEM y SHV, ahora capaces de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación: BLEE
- Producción de cefamicinasas mediada por plásmidos.
- Producción de betalactamasas resistentes a la acción de los inhibidores: IRT

El mecanismo de resistencia a los inhibidores de betalactamasas y sus combinaciones comerciales (amoxicilina-clavulánico, ampicilina-sulbactam, ticarcilina-clavulánico, cefoperazona-sulbactam y piperacilina-tazobactam) puede ser debido a diferentes mecanismos, como son la producción de betalactamasas cromosómicas como en el caso de AmpC de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella* y *Pseudomonas aeruginosa* o metalo betalactamasas de *Stenotrophomonas maltophilia* (Bush 1988) que son resistentes a la acción de los inhibidores. En otros casos la hiperproducción de betalactamasas como por ejemplo AmpC en *E.coli* o SHV-1 en *K.pneumoniae* puede reducir la acción de los inhibidores (Livermore 1995) La hiperproducción de betalactamasas TEM-1 y SHV-1 puede producir también una disminución de la sensibilidad a la acción de los inhibidores. (Wu, Shannon et al. 1995) (Miro, del Cuerpo et al. 1998). Por último, la presencia simultánea de BLEE y betalactamasas de amplio espectro reduce la susceptibilidad frente a los inhibidores. (Livermore 1995)

3. Betalactamasas

3.1. Generalidades

Las betalactamasas o penicilin amido-beta-lactamhidrolasas (EC 3.5.2.6) han sido definidas por el Nomenclature Committee of the Internacional Unión of Biochemistry como "enzimas que hidrolizan amidas, amiditas y otras uniones C-N" (Feb 1993)

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas, constituyendo el mecanismo mas común de resistencia en contra de los antibióticos betalactámicos (Ambler 1980; Collatz, Labia et al. 1990)

Las betalactamasas son la mayor defensa de las bacterias gram-negativas frente a los antibióticos betalactámicos. Son enzimas responsables de la mayor parte de los fracasos terapéuticos debido a que hidrolizan el anillo betalactámico inactivándolo (Bush 1989). En las bacterias gram-negativas, las betalactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido, mientras que las betalactamasas cromosómicas, pueden ser constitutivas o inducibles (Jacoby and Muñoz-Price 2005) (Marín and Gudiol 2003)

3.2. Clasificación de las betalactamasas

Tanto la clasificación como la nomenclatura de las betalactamasas constituyen un problema, debido a que cuando se introducía en la práctica clínica un nuevo antibiótico betalactámico aparecía, prácticamente al tiempo, una nueva betalactamasa que lo hidrolizaba, de manera que ha aumentado enormemente su número lo que requería y requiere nuevas clasificaciones y constantes actualizaciones. (Bush 1989)

Es por ello que hayan sido propuestos numerosos esquemas de clasificación de estas enzimas. El primero de ellos fue clasificarlas en penicilinasas y

cefalosporinasas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas respectivamente. Más adelante, estas enzimas han sido clasificadas de acuerdo a su perfil de sustrato, punto isoeléctrico, peso molecular, reacción con los inhibidores y otros criterios bioquímicos, así como por su origen cromosómico o plasmídico. (Heritage, M'Zali et al. 1999) (Jaurin and Grundstrom 1981) (Medeiros, Cohenford et al. 1985)

3.2.1. Antecedentes históricos

Fue en 1940 cuando se descubrió la primera betalactamasa por Abraham y Chain. El primer esquema funcional que fue aceptado fue en 1968 realizado por Sawai y cols los cuales describen penicilinasas, cefalosporinasas y de amplio espectro. Mitsuhashi e Inoue añaden en 1981 el término cefuroximasas. En 1973, Richmond y Sykes realizaron una revisión meticulosa de la literatura sobre betalactamasas, presentaron un esquema de clasificación para las betalactamasas de bacterias gram-negativas, clasificando estas enzimas en cinco grupos basándose en el perfil de sustrato. Tres años mas tarde (1976) Sykes y Matthew amplían este esquema teniendo en cuenta el punto isoeléctrico como criterio para clasificar las betalactamasas.

En 1980 Ambler clasifico las betalactamasas en función de su estructura molecular en cuatro clases (de la A la D). Asimismo indica que las betalactamasas de las clases A, C y D tienen en su centro activo serina mientras la clase B son metaloenzimas. (Ambler 1980).

Finalmente, Bush en 1989 (Bush 1989), en un esfuerzo por actualizar la clasificación de las betalactamasas, propone una modificación del esquema de Richmond y Sykes, intentando relacionar el sustrato y los perfiles de inhibición con la estructura molecular lo que ha constituido la base de la clasificación actual publicada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros.

3.2.2. Clasificación molecular de Ambler (Ambler 1980)

En base a su estructura primaria han sido propuestas cuatro clases moleculares

(de la A la D) es la clasificación molecular de Ambler. La clase A (serin-penicilinasas), clase B (metaloenzimas), clase C (serin-cefalosporinasas) y clase D (serin-oxacilinasas). La clasificación molecular reconoce tres clases de serin-enzimas y una de metaloenzimas.

- Clase A

Estas enzimas se encuentran tanto en bacterias gram-positivas como gram-negativas. Pueden ser de origen cromosómico o plasmídico. Estudios cristalográficos han demostrado que la estructura de la proteína es homologa. (Ambler, Coulson et al. 1991). El peso molecular de estas enzimas es alrededor de 25,000 daltons.

- Clase C

A este grupo pertenece la enzima ampC, la cual es una serin-cefalosporinasa con una estructura diferente a las serin-penicilinasas y serin-D-alanina carboxipeptidasas. Son proteínas de gran tamaño, el peso molecular de estas enzimas es alrededor de 39,000 daltons (Jaurin and Grundstrom 1981) Estas enzimas confieren resistencia a las oximinocefaloporinas, 7- α -metoxicefalosporinas y no son afectadas por los inhibidores. (Gupta 2007) que además de la serina contienen en el centro activo DD-transpeptidasas/carboxypeptidasas (conocida como penicilin-binding proteins PBPs).

- Clase D

A este grupo pertenecen las serin-oxacilinasas especialmente activas frente a oxacilina. Oullette y cols demostraron en 1987 la relación entre la betalactamasa OXA-1 y otras secuencias de betalactamasas. (Ouellette, Bissonnette et al. 1987) El peso molecular de estas enzimas es alrededor de 30,000 daltons. (Frere, Galleni et al. 2005).

- Clase B

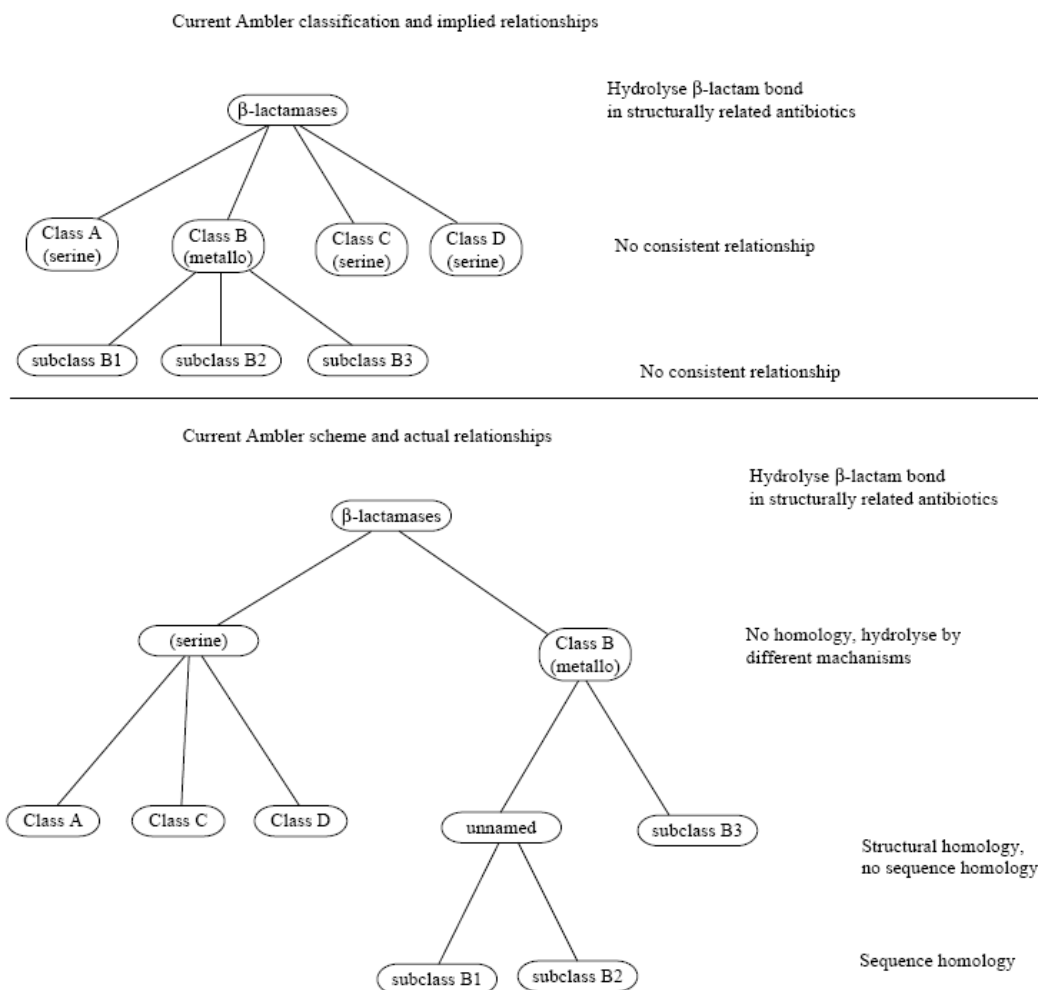
Estas enzimas difieren de las otras betalactamasas en que usan el ión zinc, para unir el residuo histidina o cisteína con el grupo carboxilo de la unión amida de la

mayoría de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas. (Gupta 2007)

La segunda gran familia, la B, es más heterogénea, y en ella se distinguen tres grupos diferentes de metalo- betalactamasas, B1, B2 y B3. B1 y B3 englobarían enzimas con amplio espectro de acción que actuarían frente a la mayoría de los betalactámicos excepto monobactámicos, mientras que B2 son Carbapenemasas las cuales presentan poca acción frente a penicilinas y cefalosporinas. Mientras que B1 y B3 presentan su máxima actividad cuando tienen dos átomos de Zn; B2 se inactiva cuando incorpora otro átomo de Zn. (Frere, Galleni et al. 2005)

De acuerdo con la revisión de Frère y cols, (Frere, Galleni et al. 2005) la clasificación de Ambler está bien establecida y se puede mantener con unas observaciones. Las betalactamasas se pueden englobar en dos superfamilias: en la primera estarían incluidas la serin- betalactamasas, a este grupo pertenecen las clases A, C y D, siendo las clases A, C las más comunes. La otra superfamilia es la clase B que a su vez tendrá tres subfamilias de metaloenzimas: B1, B2 y B3. En la figura 5 se puede ver un diagrama de la clasificación de Ambler y el esquema propuesto por Frère.

Figura 5.: Clasificación molecular de Ambler



Fuente: (Frere, Galleni et al. 2005)

3.2.3. Clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush, Jacoby et al. 1995)

Las betalactamasas se pueden clasificar sobre la base de su espectro de acción y respuesta a los inhibidores en un gran número de grupos funcionales es la clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros. Esta clasificación es la mas útil pues supone mas ayuda para el medico o microbiólogo en su diagnostico de laboratorio debido a que considera los inhibidores de betalactamasas y los sustratos de los betalactámicos. En la tabla 3 se representa un esquema de esta clasificación.

Tabla 3.: Clasificación de las betalactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros

Grupo funcional	Clase estructural	Sustrato preferido	Inhibido		Enzimas representativas
			A/C	EDTA	
1	C	Cefalotina	-	-	AmpC cefamicinasas
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinasas GP
2b	A	Penicilinas Cefalosporinas	+	-	TEM-1,TEM-2,SHV-1
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas de amplio y extendido espectro, monobactámicos	+	-	TEM-3,TEM-135, SHV-2, SHV-57, K1
2br	A	Penicilinas	+/-	-	IRT-1 (TEM-30),IRT-28 (TEM-41)
2c	A	Penicilinas Carbenicilina	+	-	PSE,CARB
2d	D	Penicilinas cloxacilina	+/-	-	OXA
2e	A	Cefalosporinas	+	-	P.vulgaris
2f	A	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenemas	+	-	Sme, IMI, GES, KPC
3a,3b,3c,	B	La mayoría de β - lactámicos carbapenemas	-	+	L1, IMP, VIM
4		Penicilinas	-	v	Penicilinasas de <i>B.cepacia</i> .

Fuente: (Bush, Jacoby et al. 1995)

- Grupo 1

Las enzimas de este grupo se correlacionan con la clase molecular C.

Pertenecen a este grupo cefalosporinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico o sulbactam, pero son inhibidas por el aztreonam y cloxacilina. Su peso molecular suele ser superior a 30,000 daltons y su punto isoeléctrico es básico. La mayor parte de ellas son de origen cromosómico e hidrolizan fundamentalmente a cefaloridina y cefalotina.

- Grupo 2

Son penicilinasas, cefalosporinasas y betalactamasas de amplio espectro que son sensibles a la acción de los inhibidores de betalactamasa y se correlacionan con las clases A o D de la clasificación molecular de Ambler. En este grupo se incluyen varios subgrupos debido a la alta diversidad de sustratos encontrados.

- Grupo 2a

Son penicilinasas que se encuentran fundamentalmente en bacterias gram-

positivas. Pertenecen a la clase molecular A.

- Grupo 2b

Estas betalactamasas son de amplio espectro actuando sobre penicilinas y cefalosporinas y son inhibidas por el ácido clavulánico. Pertenecen a la clase molecular A y son de origen plasmídico. Las enzimas TEM-1 TEM-2 y SHV-1 pertenecen a este grupo.

- Grupo 2be

A este grupo pertenecen las BLEE, betalactamasas que son capaces de hidrolizar antibióticos β -lactámicos de espectro extendido y son fuertemente inhibidas por el ácido clavulánico como por ejemplo TEM-3, CAZ-1, SHV-2, SHV-3 y betalactamasa cromosómica K1 debido a su acción sobre el aztreonam. Estructuralmente derivan del grupo 2b y son de espectro extendido (e).

- Grupo 2br

Dentro de este grupo se encuentran las enzimas mediadas por plásmidos con acción disminuida frente a amino-, carboxy- y ureido-penicilinas. Derivan de TEM-1 y TEM-2 y son las denominadas IRT (Inhibitor- resistant TEM).

Se encontraron inicialmente en *E.coli* pero en la actualidad se han informado casos en otras *Enterobacterias* (Chaibi, Farzaneh et al. 1996)

- Grupo 2c

Son carbenicilinasas que presentan mayor acción sobre penicilinas que sobre cefalosporinas, son sensibles a la acción del ácido clavulánico, con punto isoeléctrico neutro y pertenecen a la clase molecular A. En este grupo se encuentran las betalactamasas PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3 y CARB-4 presentes en *P. aeruginosa*, AER-1 en *Aeromonas hydrophila*, BRO-1 en *P. mirabilis* y *B. catarrhalis*.

- Grupo 2d

Este grupo incluye betalactamasas que hidrolizan cloxacilina y son generalmente inhibidas por el ácido clavulánico. Son oxacilinasas con punto isoeléctrico que oscila en el rango de 6.1-7.7 y pertenecen a la clase molecular D. Pertenecen a este grupo

OXA-1, OXA-4 y OXA-7 muy frecuentes en *E. coli* y PSE-2 en *P. aeruginosa*. (Huovinen, Huovinen et al. 1988) (Medeiros, Cohenford et al. 1985). De este grupo se puede separar el siguiente

- Grupo 2d

Pertenecen a este grupo oxacilinasas de espectro extendido de clase D, con inhibición moderada por el ácido clavulánico. Se han descrito en *P.aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. (Vila, Navia et al. 1997)

- Grupo 2e

Pertenecen a este grupo cefalosporinasas que son inhibidas por bajas concentraciones de ácido clavulánico lo que las diferencia de las betalactamasas del grupo 1, como por ejemplo cefalosporinasas inducible en *Proteus* descritas por Sawai y cols (Sawai, Kanno et al. 1982), la cefalosporinasa L2 de *P. maltophilia* descrita por Saino y cols (Saino, Inoue et al. 1984) y la cefalosporinasa FEC-1 descrita en *E.coli* y *Proteus*. (Bush 1989)

- Grupo 2f

Son serin-Carbapenemasas que son inhibidas débilmente por el ácido clavulánico pero no por el EDTA.

- Grupo 3

Son metalo-betalactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y carbapenemes. Son pobremente inhibidas por los inhibidores clásicos excepto EDTA y p-cloromercuribenzoato (pCMB). Son las únicas betalactamasas que pertenecen a la clase B. En este grupo esta incluida la betalactamasa L1 de *P. maltophilia* con fuerte acción hidrolítica frente a Imipenem y la betalactamasa II de *Bacillus cerus*

- Grupo 4

Son penicilinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico. Hasta el momento no se han podido englobar en ninguna clase molecular.

En la tabla 4 podemos ver la interrelación entre estas dos clasificaciones.

Tabla 4.: Interrelaciones entre las dos principales clasificaciones.

Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros	Grupos funcionales	Clasificación de Ambler	Principales características
Grupo 1 Cefalosporinas	-	C	Normalmente cromosómicas. Resistentes a la mayoría de betalactámicos excepto carbapenemas. No inhibidos por el ác.clavulánico
Grupo 2 Penicilinas (Inhibidas por ác. clavulánico)	2a	A	Penicilinas estafilococicas.
	2b	A	Amplio espectro TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	A	Espectro extendido TEM-3-160, SHV-2-101.
	2br	A	IRT
	2c	A	Carbencilinasas
	2e	A	Cefalosporinas inhibidas por clavulánico
	2f	A	Carbapenemasas inhibidas por clavulánico
Grupo 3 metalo betalactamasas	3 ^a	B (metaloenzimas)	Zinc-dependientes. Carbapenemasas
	3b	B	
	3c	B	
Grupo 4		No clasificada	La mayoría de ellas no están secuenciadas.

Fuente: (Pérez, Endimiani et al. 2007)

3.3. Producción de betalactamasas

Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma de la bacteria o en segmentos de DNA extracromosómico, denominados plásmidos los cuales son los responsables de la diseminación de la mayor parte de las betalactamasas. Los genes que codifican algunas betalactamasas son transportados por transposones y muchos genes son encontrados en integrones, los cuales a menudo incluyen genes que confieren resistencia a otros antibióticos. (Jacoby and Muñoz-Price 2005). Las principales betalactamasas responsables de la resistencia en los bacilos gram-negativos son la betalactamasa inducible AmpC (clase C) y las betalactamasas plasmídicas de amplio espectro y de espectro extendido (BLEE -clase A). (Levison 2002)

3.3.1. Betalactamasas cromosómicas

Muchas bacterias gram-negativas poseen betalactamasas cromosómicas que podrían derivar de las penicillin binding proteins (PBP) con las que comparte alguna homología. Su origen sería debido a la presión selectiva ejercida por los betalactámicos sobre microorganismos del suelo encontrados en el ambiente. (Gupta 2007)

Todas las enterobacterias excepto *Salmonella spp.* poseen una betalactamasa cromosómica la cual juega un papel importante tanto en la síntesis de la pared celular como en la protección de la bacteria frente a los antibióticos betalactámicos y además es responsable de la resistencia intrínseca dentro de cada especie. (Susic 2004)

Las betalactamasas cromosómicas pueden ser de producción constitutiva (alto o bajo nivel) o inducible. (Livermore 1995)

Algunos microorganismos poseen betalactamasas antes del uso de los antibióticos como AmpC de enterobacterias. La razón de ello podría ser que estas enzimas juegan un papel importante en la síntesis del peptidoglicano o bien

defienden a la bacteria frente a otras bacterias y hongos. (Jacoby and Muñoz-Price 2005)

E. coli posee una betalactamasa AmpC constitutiva de bajo nivel la cual no contribuye a la resistencia frente a los antibióticos betalactámicos. Por el contrario, *P. aeruginosa* y otras enterobacterias principalmente *E. aerógenes* presentan una betalactamasa AmpC inducible. La producción de AmpC en ausencia del antibiótico inductor se mantiene en un estado reprimido y prácticamente no se produce debido a la acción de los genes reguladores (*ampR*, *ampD*, *ampE*, *ampG*).

En presencia del antibiótico inductor estos mismos genes permiten la expresión de la enzima, lo que se denomina estado "desreprimido reversible". Puede suceder que mutaciones en los genes reguladores provoquen la expresión de grandes cantidades de la enzima constitutiva es el denominado estado "desreprimido estable", estos mutantes son resistentes a cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, cefamicinas, penicilinas de amplio espectro e inhibidores de β -lactamasas. (Levison 2002)

3.3.2. Betalactamasas plasmídicas

En general las betalactamasas plasmídicas son diferentes a las betalactamasas cromosómicas, pero en algunos casos existe un solapamiento, como por ejemplo en el caso de SHV-1 que normalmente es una betalactamasa plasmídica pero en *K. pneumoniae* es cromosómica. (Matthew, Hedges et al. 1979) (Jacoby and Muñoz-Price 2005) y la AmpC que puede presentarse en plásmidos.

Las betalactamasas plasmídicas incluyen las betalactamasas de amplio espectro, las betalactamasas de espectro extendido (que se desarrollan en el punto 3.4), las betalactamasas resistentes a los inhibidores, las cefamicinasas AmpC y las Carbapenemasas.

3.3.2.1. Betalactamasas de amplio espectro

Dentro de este grupo están incluidas TEM-1, TEM-2, SHV-1 y las de tipo OXA.

Las betalactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 pertenecen a la clase molecular A y son inhibidas por el ácido clavulánico. Presentan actividad frente a bencilpenicilinas, amino-, carboxi y ureido-penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido (cefazolina, cefalotina, cefuroxima, cefamandol). Ninguna de estas betalactamasas hidroliza cefalosporinas de tercera generación, cefamicinas, monobactams o carbapenemas. (Jacoby and Munoz-Price 2005) (Heritage, M'Zali et al. 1999)

TEM-1 es la primera betalactamasa plasmídica descrita en 1965 en una cepa de *E.coli* de un paciente en Atenas. En cuanto a la nomenclatura de las betalactamasas el origen de TEM deriva del nombre de la paciente llamada Temoniera donde se aisló por primera vez esta betalactamasa; Es capaz de hidrolizar penicilinas (mas del 75% de las cepas de *E.coli* presentan el fenotipo de resistencia a penicilinas por producción de TEM-1) y cefalosporinas, proporcionando resistencia a la bacteria frente a estos antibióticos; por el contrario presenta una actividad insignificante frente a las cefalosporinas de espectro extendido y es inhibida por el ácido clavulánico. (Palzkill and Botstein 1992) (Paterson and Bonomo 2005)

La betalactamasa **TEM-2** tiene el mismo perfil hidrolítico que TEM-1, presentando una mayor actividad innata excepto frente a meticilina y cefazolina. Ambas enzimas difieren en un aminoácido en la posición 39 Glu-39→Lys (Chaibi, Farzaneh et al. 1996). Asimismo, tienen diferente punto isoeléctrico (5.6 comparado con 5.4). **TEM-13** presenta también el mismo perfil hidrolítico. (Jacoby and Medeiros 1991) (Paterson and Bonomo 2005)

La betalactamasa **SHV-1** (SHV se refiere a la variable sulfhídrica) fue inicialmente descrita en el genero *Klebsiella* como β -lactamasa cromosómica. Estudios posteriores demostraron que esta enzima es idéntica a PIT-2 enzima codificada por plásmidos y transportada en transposones.

LEN-1 es una betalactamasa cromosómica encontrada en cepas de *K.pneumoniae*. Estudios genéticos demuestran las similitudes entre el gen bla^{SHV-1}, el gen bla^{LEN-1} y el gen bla^{OHI0-1}. El análisis de la secuencias de aminoácidos

demuestran que SHV-1 comparte un 91.8% de similitud con OHIO-1, un 88.9% con LEN-1 y un 63.7% con TEM-1. Los perfiles bioquímicos y la cinética enzimática son muy similares entre estos tres enzimas. (Heritage, M'Zali et al. 1999)

Las betalactamasas pertenecientes a la familia **OXA** hidrolizan cefalosporinas de espectro reducido, cloxacilina, meticilina y oxacilina. Son débilmente inhibidas por el ácido clavulánico y pertenecen a la clase D. (Jacoby and Muñoz-Price 2005) Originalmente las BLEE tipo OXA fueron descubiertas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. (Weldhagen, Poirel et al. 2003) pero en la actualidad se pueden encontrar en Enterobacterias como OXA-1 que ha sido encontrada en un 1-10% de los aislamientos de *E.coli*. (Livermore 1995)

Las betalactamasas tipo OXA fueron originalmente consideradas como un grupo fenotípico mas que genotípico ya que algunas de ellas presentaban un perfil hidrolítico específico. De manera que solo existe entre algunos miembros de la familia un 20% de homología (Bradford 2001)

3.3.2.2. IRT

Estas enzimas derivan de las betalactamasas clásicas y se caracterizan por conferir resistencia a amino-, carboxi- y ureidopenicilinas, son insensibles a la acción de los inhibidores de betalactamasa, y no tienen actividad sobre el resto de betalactámicos. Se han denominado IRT (inhibitor-resistant TEM) porque en su mayoría derivan de TEM-1 y TEM-2, aunque también se han descrito derivadas de SHV-1. (Chaibi, Sirot et al. 1999)

La mayoría de los aislamientos presentan escasa sensibilidad a cefalosporinas de amplio espectro, cefamicinas y carbapenemas, así como frente a piperacilina-tazobactam. Son resistentes a ampicilina-sulbactam y presentan una resistencia intermedia o son resistentes a amoxicilina-clavulánico. (Chaibi, Farzaneh et al. 1996) (Cantón, Novais et al. 2008)

Sustituciones aminoácidas en las betalactamasas originales son las responsables de los perfiles de resistencia siendo las mas importantes las

sustituciones en las posiciones Met69, Arg244, Asn276 y Leu275 de TEM-1 y TEM-2 (Chaibi, Sirot et al. 1999) (Knox 1995)

Uno de los aspectos más interesantes en la evolución de las IRT es la aparición de las mutaciones en el gen *bla*_{TEM} que afectan a las cefalosporinas de espectro extendido y a los inhibidores de betalactamasas.

No hay que olvidar que las oxacilinasas (como la OXA-1), producen un fenotipo indistinguible del de las IRT.

3.3.2.3. Cefamicinasas plasmídicas de clase C

Las cepas productoras de betalactamasas plasmídicas de espectro extendido tradicionales no confieren resistencia a las cefamicinas. En los últimos años, sin embargo, se han descrito betalactamasas plasmídicas que confieren resistencia no sólo a cefalosporinas de tercera generación sino también a cefamicinas, por lo que se conocen como cefamicinasas plasmídicas. La mayor parte de estas enzimas se han descrito en *K. pneumoniae*, aunque también se han identificado en *E. coli* y en *Achromobacter sp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.* (Livermore 1995) (Philippon, Arlet et al. 2002)

Este tipo de enzimas suelen tener un pI básico, incluso superior a 10, y confieren resistencia a cefamicinas y cefalosporinas (incluidas las de tercera generación), pero no a carbapenemes. No se inhiben por ácido clavulánico pero sí por aztreonam, excepto FEC-1 y MOX-1 que constituyen una excepción (Livermore 1995)

La nomenclatura de estas enzimas es en función de su perfil de resistencia a cefamicinas (CMY), cefoxitina (FOX), moxalactam (MOX), latamoxef (LAT); el lugar donde se descubrió Hospital Miriam en Providence (MIR-1) o el nombre del paciente donde se aisló por primera vez BIL-1. (Philippon, Arlet et al. 2002)

En 1976, Bobrowski y cols describen una betalactamasas mediada por plásmidos en una cepa de *Proteus mirabilis* la cual es indistinguible de Amp^C en *E. coli*. Desafortunadamente el plásmido original se perdió (Bobrowski, Matthew et

al. 1976) En 1982, Levesque y cols informaron una cefalosporinasa aislada en *Achromobacter* spp. (Levesque and Roy 1982). Un año más tarde, Knothe y cols informan de la transferencia de la resistencia a cefoxitina entre algunas especies de *Enterobacterias* pero no realizan estudios bioquímicos o moleculares. (Knothe, Shah et al. 1983). En 1989, Baurernfeind y cols también describen la posible transferencia de resistencia a cefoxitina y cefotetan entre especies de *Enterobacterias*. (Bauernfeind, Chong et al. 1989) . La primera prueba de la existencia de una betalactamasa plasmídica de clase C fue aportada por Papanicolau y cols, los cuales describieron la transmisión de resistencia a cefamicinas mediada por una enzima denominada MIR-1, que presenta propiedades bioquímicas de betalactamasa clase 1 y el gen que codifica esta enzima presenta una analogía de un 90% con el gen AmpC de *E. cloacae*. (Papanicolaou, Medeiros et al. 1990)

Desde entonces hasta ahora se han descrito numerosas betalactamasas plasmídicas AmpC en aislamientos MIR-1 en Estados Unidos, CMY-2 en Corea del Sur, BIL-1 en Pakistán, FOX-1 en Argentina, LAT-1 en Grecia, FEC-1, MOX-1 en Japón y CMY-3 en el Reino Unido. (Livermore 1995) , DHA-1 en Arabia Saudita (Barnaud, Arlet et al. 1998). Las representantes mejor caracterizadas son MIR-1, MOX-1, CMY-1, CMY-2, BIL-1, LAT-1 y FOX-1.

En algunos casos se conocen la secuencia de nucleótidos de los genes que controlan la producción de estas enzimas. Barnaud y cols secuenciaron la betalactamasa DHA-1 y demostraron una alta similitud con la cefalosporinasa cromosómica de *Morganella morganii*, la secuencia de nucleótidos en el gen AmpC y su gen regulador AmpR es muy similar a la región AmpC-AmpR en un 97-98% de *Morganella morganii*. (Barnaud, Arlet et al. 1998). En el año 2001, Fortineau y cols describen una nueva cefalosporinasa inducible DHA-2 en *K.pneumoniae* (Fortineau, Poirel et al. 2001)

En la actualidad disponemos de test fenotípicos que permiten diferenciar las betalactamasas AmpC plasmídicas de las cromosómicas. (Mirelis, Rivera et al.

2006)

3.3.2.4. Carbapenemasas

Los carbapenemes, son el grupo de antibióticos betalactámicos más estables a la hidrólisis por las betalactamasas. Dentro de este grupo se encuentran imipenem, meropenem y ertapenem. Son resistentes a la acción de la mayoría de las enzimas, incluso a AmpC y betalactamasas plasmídicas de espectro extendido de tipo TEM, SHV, CTX-M y OXA.

Las Carbapenemasas son activas frente a las oximino-cefalosporinas, cefamicinas y carbapenemes. (Nordmann and Poirel 2002) La primera carbapenemasa conocida fue descrita en *Bacillus cereus* (betalactamasa II). Posteriormente se describió en *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium odoratum*, *Legionella gormanii* y *Bacteroides fragilis*.

Recientemente se han identificación y caracterización Carbapenemasas plasmídicas en *Pseudomonas aeruginosa*, en diferentes especies de *Enterobacteriaceae* y en *Acinetobacter* lo que ha generado un mayor interés por su estudio y puede suponer un nuevo reto para la antibioterapia.

La resistencia a los carbapenemes no solo es debida a la producción de Carbapenemasas, ya que existen otros mecanismos que pueden afectar a su actividad, como son: pérdida de porinas específicas, bombeo o expulsión del antibiótico y modificaciones en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP). (Poirel, Heritier et al. 2004)

Atendiendo a la clasificación molecular de Ambler, las Carbapenemasas pueden clasificarse en tres grupos: clase A, clase B y clase D:

- Carbapenemasas **clase A**

Pertenecen al grupo 2f de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Son inhibidas débilmente por el ácido clavulánico pero no por el EDTA. (Bush, Jacoby et al. 1995)

Puede ser de producción cromosómica (NMC-A, Sme-1, Sme-3 y IMI-1) en

Enterobacter cloacae y *Serratia marcescens*, o codificadas por plásmidos, como KPC-1 en *K. pneumoniae* y GES-2 en *Pseudomonas aeruginosa*. (Nordmann and Poirel 2002)

Los primeros aislamientos se produjeron en Japón en 1990 tanto en especies de *Enterobacterias* como en *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Mas tarde han sido informados aislamientos en otras partes del mundo como Europa, Canadá y Brasil (Jacoby and Muñoz-Price 2005)

En la actualidad se ha informado un aislamiento en *Enterobacter asburiae* con IMI-2 la primera carbapenemasa codificada por plásmidos e inducible. (Aubron, Poirel et al. 2005)

- Carbapenemasas **clase B**

Son las Carbapenemasas más significativas desde el punto de vista clínico. Pertenecen al grupo 3 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, son metaloenzimas, requieren zinc para su actuación y son generalmente de naturaleza cromosómica, aunque recientemente se han asociados a plásmidos conjugativos e integrones. (Toleman, Rolston et al. 2004)

Son inhibidas por EDTA, pero no por ácido clavulánico. Estas enzimas hidrolizan a las penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas pero no al aztreonam.(Livermore 1995)

- Carbapenemasas **clase D**

A este grupo pertenecen algunas β -lactamasas tipo OXA que presentan una débil actividad carbapenemasa. (Poirel, Heritier et al. 2004) (Jacoby and Bush 2005)

Han sido descritas en *Acinetobacter baumannii* disminuyen la sensibilidad a imipenem y meropenem (Nordmann and Poirel 2002).

3.4. Betalactamasas de espectro extendido

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que hidrolizan a las cefalosporinas de espectro extendido que contienen una cadena lateral

oximino; entre las que están incluidas la ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y también el aztreonam. No actúan sobre cefamicinas ni carbapenemes. Son inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas como el sulbactam o tazobactam. (Patterson 2003).

Las BLEE han emergido en las dos últimas décadas como un problema creciente que dificulta el tratamiento de infecciones producidas por las bacterias portadoras. (Gobernado 2005)

Su aparición se asocia al uso excesivo de las cefalosporinas de amplio espectro y el aztreonam. Fue en los años 80 cuando se introdujeron en la práctica clínica las cefalosporinas de tercera generación, estas cefalosporinas fueron desarrolladas en respuesta a un incremento en la prevalencia de betalactamasas en algunos microorganismos y a la extensión de estas a nuevos hospedadores. Estas cefalosporinas presentan menor nefrotoxicidad que los aminoglucósidos y las polimixinas, de ahí que se usaran más. (Paterson and Bonomo 2005)

Son enzimas de configuración plasmídica producidas por bacilos gram-negativos, principalmente enterobacterias, en concreto *E.coli* y *Klebsiella pneumoniae*, pero también pueden aparecer en bacilos no fermentadores y otras enterobacterias.

Derivan de las betalactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1), pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros; cuando estas sufren mutaciones (el hecho de que se produzca un cambio de uno o mas aminoácidos implica una apertura del sitio activo del enzima permitiendo un mayor acoplamiento de la gran cadena lateral del betalactámico) en el centro activo dan lugar a estas otras betalactamasas de espectro extendido, que hidrolizan a las cefalosporinas de tercera generación y a los monobactámicos, clasificándose en el subgrupo 2be (clase molecular A); No todas las BLEE pertenecen al grupo 2be, ya que algunas oxacilinasas, que pertenecen al grupo 2d (clase molecular D), son BLEE. (Philippon, Labia et al. 1989) (Patterson 2003)

Fue en 1983 en Alemania cuando se aisló por primera vez una BLEE, en una cepa

de *Klebsiella ozaenae*, la cual recibió el nombre de SHV-2. En España la primera BLEE se describió en 1988, detectándose poco después los primeros brotes. (Knothe, Shah et al. 1983)

A parte de las TEM y SHV en 1989 se describió otro tipo de BLEE las cefotaximasas o CTX-M, derivan de betalactamasas cromosómicas de especies del género *Kluyvera*, pertenecen a la clase molecular A y son resistentes a cefotaxima, cefuroxima cefepima y en menor medida a ceftazidima. (Walther-Rasmussen and Hoiby 2004)

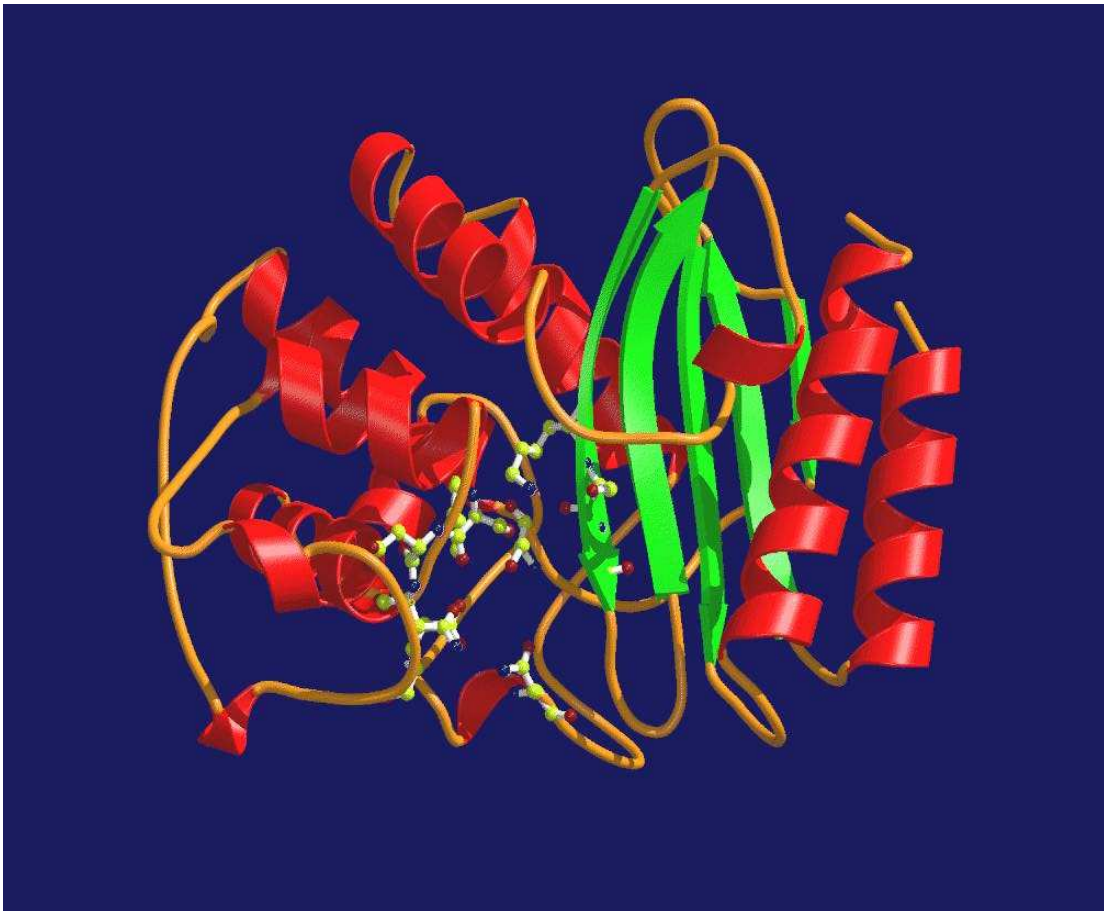
3.4.1. BLEE tipoTEM

En 1987 se aisló en Francia una cepa de *Klebsiella pneumoniae* que contenía una betalactamasa mediada por plásmidos, esta enzima fue inicialmente denominada CTX-1 porque es activa frente a cefotaxima. En la actualidad se denomina **TEM-3** y difiere de TEM-2 en la sustitución de dos aminoácidos. (Sirot, Sirot et al. 1987) (Paterson and Bonomo 2005)

Las BLEE tipo TEM son derivadas de las betalactamasas de amplio espectro TEM-1 y TEM-2, por modificación en la secuencia de aminoácidos lo que provoca cambios en la estabilidad de la enzima y en el perfil hidrolítico. (Blázquez, Morosini et al. 1995)

El primer paso para poder comprender la relación entre las mutaciones y la estructura tridimensional es recordar la estructura terciaria tridimensional de las betalactamasas TEM-1 (ver figura 6) y TEM-2.

Figura 6.: Estructura tridimensional de una betalactamasa.



La betalactamasa TEM-1 es una proteína globular formada por dos dominios. Uno de ellos contiene una cadena α -hélice (formada por ocho hélices H2-H9) y el otro dominio está formado por la lámina- β que contiene cinco láminas antiparalelas (β 1 a β 5) y tres hélices (H1, H10, H11) alrededor de la α -hélice. El centro activo de la enzima se encuentra situado en el extremo Nt de la α -hélice H2. (Knox 1995)

Huang y cols estudiaron los residuos de aminoácidos críticos para la estructura y función de la enzima encontrando que de 263 residuos aminoácidos que contiene TEM-1, 43 son insustituibles. (Huang, Petrosino et al. 1996; Paterson and Bonomo 2005)

Glu-39→**Lys**. **TEM-2** es la primera variante en la que se describió esta sustitución. Se produce un cambio ligero en el patrón de susceptibilidad frente a

ceftazidima y cefaloridina. Esta mutación es frecuente en TEM-3, TEM-7, TEM-8, TEM-11, TEM-13, TEM-14, TEM-16, TEM-18, TEM-24. (Blázquez, Morosini et al. 1995).

Glu-104→Lys. Esta mutación da lugar a la variante **TEM-17**. También aparece en TEM-3, TEM-4, TEM-6. (Blázquez, Morosini et al. 1995). Al producirse la sustitución del Glu por Lys como esta última presenta una cadena lateral con carga positiva atraería al grupo carboxilo de ceftazidima y aztreonam. (Knox 1995)

Arg-164→Ser. **TEM-12 (Ser)** y **TEM-29 (His)** disminuye la sensibilidad a cefotaxima, aztreonam y principalmente a ceftazidima: el meropenem no se ve afectado por esta mutación. (Blázquez, Morosini et al. 1995)

Ala-237→Thr. No se produce una apreciable variación en el perfil hidrolítico debida a esta mutación, aparece en TEM-5 y TEM-24. (Blázquez, Morosini et al. 1995)

Gly-238→Ser. **TEM-19** La presencia de esta mutación provoca una disminución en la sensibilidad frente amoxicilina-clavulánico y cefotaxima. (Blázquez, Morosini et al. 1995).

Glu-240→Lys. Se produce fundamentalmente un cambio en el patrón de sensibilidad frente a ceftazidima y aztreonam y ha sido identificada en TEM-5, TEM-10 y TEM-24. (Blázquez, Morosini et al. 1995)

Thr-265→Met. Se observa una disminución de sensibilidad frente a cefaloridina y ha sido identificada en TEM-4, TEM-9, TEM-13, TEM-14. (Blázquez, Morosini et al. 1995)

Existe una diferencia notable en el nivel de resistencia que confieren estas variantes a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, excepto en los siguientes casos TEM-3, TEM-4, TEM-20 y TEM-21, son más activos frente a ceftazidima en aislados de *E.coli*. (Jacoby and Medeiros 1991)

En 1982 en una unidad de cuidados intensivos en un hospital de Inglaterra se produjo una brote epidémico con una cepa de *Klebsiella oxytoca* portadora de una betalactamasa TEM-1. Se utilizó ceftazidima en el tratamiento y posteriormente

se produjeron aislamientos en la misma unidad de *Klebsiella oxytoca* pero esta vez portadora de BLEE, la que fue denominada **TEM-12**. Esto representa un buen ejemplo de cómo esta relacionada la presencia de BLEE con el uso de cefalosporinas de amplio espectro. (Du Bois, Marriott et al. 1995) (Paterson and Bonomo 2005)

Recientemente se ha informado de una nueva variante TEM en *Citrobacter koseri* la denominada **TEM-134** que difiere de TEM-1 por sustitución de 4 aminoácidos. (Perilli, Mugnaioli et al. 2005)

Se han descrito más de 160 tipos diferentes de betalactamasas tipo TEM, la mayoría de las cuales son BLEE (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) (Jacoby and Muñoz-Price 2005) Presentan un rango de puntos isoeléctricos que van desde 5.2 a 6.5. (Paterson and Bonomo 2005) (Cantón, Novais et al. 2008). También se han descrito cepas que producen enzimas TEM resistentes a los inhibidores (IRT), estas enzimas difieren de las TEM-1 y TEM-2 por sustitución de 1, 2 o 3 aminoácidos en diferentes posiciones. (Chaibi, Sirot et al. 1999)

3.4.2. BLEE tipo SHV

En 1983 se aisló una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania que poseía una betalactamasa con una actividad hidrolítica mayor frente a cefotaxima que frente a ceftazidima. (Knothe, Shah et al. 1983), más tarde se demostró que esta enzima difería de **SHV-1** (7.6) por la sustitución de la glicina por serina en la posición 238 (Gly-238→Ser). Esta única sustitución confiere actividad frente a cefalosporinas de amplio espectro y fue denominada **SHV-2** (7.6). (Barthelemy, Peduzzi et al. 1988)

Las betalactamasas SHV aparecen principalmente en el género *Klebsiella* aunque también pueden encontrarse en otras enterobacterias. (Tzouvelekis and Bonomo 1999). Las betalactamasas SHV comparten similitudes en cuanto a estructura y función con las betalactamasas TEM.

Hasta la fecha existen más de 100 variantes de betalactamasas SHV en

bacilos gram-negativos, la mayoría de las cuales presentan espectro extendido (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) (Jacoby and Muñoz-Price 2005) (Arpin, Labia et al. 2001) (Cantón, Novais et al. 2008) Estas BLEE tipo SHV derivan de la betalactamasa SHV-1. Sustituciones en aminoácidos críticos en el centro activo de la enzima es lo que provoca el aumento del espectro de acción. Estos cambios de aminoácidos provocan un agrandamiento del centro activo de la enzima permitiendo el acoplamiento de la larga cadena lateral R de las cefalosporinas de tercera generación. (Tzouveleakis and Bonomo 1999).

Se han utilizado técnicas como PCR-SSCP combinadas con PCR-RFLP para la caracterización de las SHV en estudios epidemiológicos. (Chanawong, M'Zali et al. 2000)

En 1988, Jarlier y cols aislaron la **SHV-3** (7.0) de un paciente en una unidad de cuidados intensivos en Francia, donde también se había detectado SHV-2. SHV-2 y SHV-3 presentan el mismo perfil inhibitorio y actúan frente a cefalosporinas de amplio espectro y difieren en un aminoácido en posición 205 que en SHV-3 es la arginina y en SHV-1 es la leucina. SHV-3 tiene también un residuo de serina en posición 238, al igual que SHV-2. (Jarlier, Nicolas et al. 1988) (Heritage, M'Zali et al. 1999)

SHV-4 (7.8) se aisló al igual que SHV-3 en un hospital Francés, presentando como única diferencia el aminoácido en posición 240 ácido glutámico por lisina. (Bure, Legrand et al. 1988)

La primera variante de SHV-1 que no fue observada en Europa sino en Chile fue **SHV-5** (pI 8.2) fue también encontrada en *Klesiella pneumoniae*. Esta enzima presenta mayor actividad frente a ceftazidima y monobactámicos que otras betalactamasas. Estudios de hibridación sugieren que podría ser derivada SHV-2 o SHV-4. (Gutmann, Ferre et al. 1989).

En 1991, Arlet y cols identificaron la betalactamasa **SHV-6** (7.6). Esta betalactamasa tiene similares perfiles de inhibición y sustrato que SHV-1, (Arlet, Rouveau et al. 1991) la diferencia estriba en la sustitución del aminoácido alanina

por ácido aspártico en posición 179 (Arlet, Rouveau et al. 1997). Esta enzima confiere resistencia a ceftazidima pero no a cefotaxima o aztreonam. (Bradford, Urban et al. 1995)

SHV-7 (7.6) fue la primera enzima de esta clase aislada en *E.coli* en 1995 en una residencia geriátrica en Estados Unidos. Confiere resistencia a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. Deriva de SHV-5 de la cual se diferencia por dos sustituciones isoleucina en posición 8 por fenilalanina y en la posición 43 la arginina por serina. (Heritage, M'Zali et al. 1999). Las betalactamasas SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 y SHV-7 poseen en la posición 238 una serina en vez de glicina, lo cual es responsable de la acción sobre cefotaxima. La sustitución de lisina por glutámico en la posición 240 en SHV-4, SHV-5 y SHV-7 contribuye a ampliar el espectro de acción a ceftazidima y aztreonam. (Bradford, Urban et al. 1995)

SHV-8 (7.6) difiere de SHV-1 en la posición 179 se sustituye la asparragina por ácido aspártico. (Rasheed, Jay et al. 1997)

En 1995, se aisló en un hospital griego la betalactamasa **SHV-9** (8.2) confiere resistencia a ceftazidima y aztreonam. Presenta en común con SHV-5 la Ser-238 y Lys-240, y difiere en una delección y tres sustituciones. (Prinarakis, Miriagou et al. 1997)

En un aislamiento de *E.coli* en 1997, fue detectada la única betalactamasa SHV resistente a inhibidores, **SHV-10** (8.2), en la cual Ser-130 es reemplazada por Gly. (Prinarakis, Tzelepi et al. 1996)

Dos nuevas variantes **SHV-11** (7.6) y **SHV-12** (8.2) son descritas en 1997 por Nuesch-Inderbinen y cols. (Nuesch-Inderbinen, Kayser et al. 1997)

Arpin y cols en 2001 caracterizaron la betalactamasa **SHV-16** (7.6). Esta enzima presenta poca acción frente a penicilinas pero es muy activa frente a ceftazidima. Deriva de SHV-1 por duplicación de cinco aminoácidos en el giro w, el cual forma parte del centro activo de las betalactamasas de la clase A. (Arpin, Labia et al. 2001)

Heritage y cols en 2003 aíslan en una cepa de *K. pneumoniae* la betalactamasa

SHV-34, análisis de la secuencia de nucleótidos demuestran que en $\text{bla}_{\text{SHV-34}}$ hay una mutación en el codon 64 ácido glutámico por glicina. (Heritage, Chambers et al. 2003).

A lo largo de estos años se han ido caracterizando más SHV como **SHV-49** (7.6) al igual que SHV-10 es resistente a los inhibidores ha sido descrita en *K.pneumoniae* a diferencia de SHV-10 que fue aislada en *E.coli* (Dubois, Poirel et al. 2004), **SHV-57** (8.2) deriva de SHV-1 por sustitución de arginina por leucina en posición 169 en el giro w. (Ma, Alba et al. 2005)

Como vemos, existe una fuerte interrelación entre estructura y función, la sustitución de uno o más aminoácidos en el centro activo de la betalactamasa, conlleva un cambio de estructura y como resultado una modificación en su espectro de acción. Dentro de la familia de las betalactamasas SHV podemos hablar de varios cambios importantes de aminoácidos como por ejemplo, la sustitución de serina por glicina en posición 238 en SHV-2 provoca que la cavidad en la que se acopla el betalactámico se agrande, de manera que la cefotaxima y ceftazidima pueden unirse y como resultado hidrolizarse. No obstante este cambio conlleva la desventaja de que el anillo betalactámico se aleja del centro activo de la enzima en la posición 70, por lo que disminuye la eficacia de estas enzimas. Para compensar esta disminución de la actividad enzimática se producen mutaciones en la secuencia del promotor incrementando la síntesis de betalactamasas de espectro extendido. (Knox 1995) (Huletsky, Knox et al. 1993), la sustitución de ácido aspártico por asparragina en la posición 179 de SHV-8 y por alanina en SHV-6 permite el acoplamiento de cefalosporinas de tercera generación. (Nuesch-Inderbinen, Hachler et al. 1995)

Otras sustituciones incrementan la actividad hidrolítica frente a ceftazidima y aztreonam como la sustitución de lisina en la posición 240 por ácido glutámico en SHV-4, SHV-5, SHV-7, SHV-9, SHV-10, SHV-12 (Sowek, Singer et al. 1991; Medeiros 1997), mutaciones en la posición 205 ocurren en SHV-3 y SHV-4. El mecanismo exacto de cómo estas alteraciones en la estructura provocan un

aumento de la actividad enzimática no está todavía aclarado.

Por último, alteraciones en la posición 130 aparecen en SHV-10 (Prinarakis, Miriagou et al. 1997)

3.4.3. BLEE tipo CTX - M

A principios de 1989, en Alemania Bauernfeind y cols informan de un aislamiento clínico de una cepa de *E.coli* resistente a cefotaxima, la cual es productora de una BLEE no TEM, no SHV denominada CTX-M-1, en referencia a su mayor actividad frente a cefotaxima. (Bauernfeind, Grimm et al. 1990)

El nombre CTX refleja la potente actividad hidrolítica de estas betalactamasas frente a cefotaxima. Estas enzimas presentan mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima y ceftriaxona que frente a ceftazidima. Los microorganismos productores de estas betalactamasas suelen tener unas CMI para cefotaxima > 64 µg/ml y para ceftazidima en el rango de sensibilidad 2-8 µg/ml; pero en algunos casos las CMI para ceftazidima alcanzan valores de 256 µg/ml (Paterson and Bonomo 2005), como por ejemplo las betalactamasas CTX-M-15 y CTX-M-32 difieren de CTX-M-3 en la sustitución de Asp-240→Gly lo que hace que estas enzimas presenten actividad frente a ceftazidima. (Poirel, Gniadkowski et al. 2002) (Cartelle, del Mar Tomas et al. 2004). Las CMIs para aztreonam son variables. Estas betalactamasas son más activas frente a cefepime que el resto de las BLEE, presentando CMIs para cefepime más altas. Por último, tazobactam presenta mayor actividad frente a las BLEE tipo CTX que el ácido clavulánico. No hay que olvidar que un mismo organismo puede contener BLEE tipo CTX junto con SHV o junto a betalactamasa tipo AmpC, lo que implica un cambio en su fenotipo de resistencia. (Paterson and Bonomo 2005)

Estas betalactamasas están estrechamente relacionadas con las betalactamasas cromosómicas de distintas especies del género *Kluyvera*. El grupo 1 y 2 derivarían de betalactamasas cromosómicas de *Kluyvera ascorbata* (Rodríguez, Power et al. 2004) mientras que el grupo 8 y 9 derivarían de

betalactamasas cromosómicas de *Kluyvera georgiana* (Olson, Silverman et al. 2005)

Se reconocen más de 65 variantes de betalactamasas CTX-M las cuales se encuentran divididas en 5 subclases en función de la homología en la secuencia de aminoácidos, llamadas CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. El grupo CTX-M-1 incluye 6 enzimas mediadas por plásmidos (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15 y FEC-1), el grupo CTX-M-2 incluye 8 (CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 y Toho-1), el grupo CTX-M-8 incluye un solo enzima, el grupo CTX-M-9 incluye 9 (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 y Toho-2) y por ultimo, el grupo CTX-M-25 incluye CTX-M-25 y CTX-M-26. (Bonnet 2004) (Livermore, Cantón et al. 2007) (Jacoby and Muñoz-Price 2005)

Toho 1 y Toho 2 son betalactamasas relacionadas estructuralmente con las betalactamasas tipo CTX como estas presentan una actividad más potente frente a cefotaxima. La denominación de Toho se refiere al nombre del hospital en Japón donde fue aislada una cepa de *E.coli* portadora de esta betalactamasa. En la actualidad son CTX-M-44 y 45 respectivamente. (Paterson and Bonomo 2005).

Las betalactamasas CTX-M excepto Toho-2 poseen 291 residuos aminoacídicos. El rango de pI es de 7.4-9 (Bonnet 2004)

Al igual que ocurre con las betalactamasas SHV y TEM existe una relación importante entre estructura y función. Los aminoácidos en posición 240 y 267 juegan un papel importante en la evolución de estas betalactamasas. Las enzimas CTX-M-15, CTX-M-27, CTX-M-16, derivan de CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14 respectivamente, por sustitución de Gly-240→Asp presentando una potente acción frente a ceftazidima. (Poirel, Gniadkowski et al. 2002) La betalactamasa CTX-M-19 deriva de CTX-M-18 por substitución de Pro-167→Ser lo que le proporciona mayor actividad frente a ceftazidima. (Poirel, Naas et al. 2001).

Otros residuos aminoacídicos juegan también un papel importante como son Arg-276, la sustitución de asparragina por arginina confiere bajo nivel de

resistencia a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam, estos resultados indican que la Arg-276 podría estar implicada en la hidrólisis de los oximino betalactámicos, por otra parte el residuo Arg-276 ocupa el mismo lugar que el residuo Arg-244 en otras betalactamasas de la clase A (Gazouli, Legakis et al. 1998).

En relación al residuo Ser-237, la sustitución Ser-237→Ala induce a una disminución de la actividad hidrolítica frente a cefotaxima (Gazouli, Tzelepi et al. 1998)

Los residuos Asn104, Asn132, y Asp240 establecen puentes de hidrogeno con los grupos amido de la cadena de la cefotaxima, lo que facilitaría su hidrólisis. La sustitución Asp-240→Gly en CTX-M-1 da lugar a CTX-M-32 aumentando la capacidad de hidrolítica frente a ceftazidima. (Cartelle, del Mar Tomas et al. 2004)

Finalmente, en la actividad cefotaximasa de CTX-M interviene no solo los ajustes producidos en el centro activo de la enzima sino también la situación global del giro w y la lámina β 3. (Bonnet 2004)

Hasta finales de 1990s las BLEE mas frecuentemente encontradas eran derivadas de TEM y SHV principalmente en *K. pneumoniae* y en pacientes hospitalizados (Yuan, Aucken et al. 1998) En la actualidad las enzimas CTX-M están reemplazando a las TEM y SHV y esta aumentando el porcentaje de aislamientos en *E.coli* y en pacientes comunitarios. En España la CTX predominante es el grupo CTX-M-9. (Livermore, Cantón et al. 2007).

3.4.4. BLEE tipo OXA

Las betalactamasas tipo OXA pertenecen a la clase molecular D y al grupo funcional 2d, se caracterizan por su alta actividad hidrolítica frente a cloxacilina y oxacilina. Son resistentes a ampicilina, cefalotina y son débilmente inhibidas por el ácido clavulánico. (Bush, Jacoby et al. 1995) (Paterson and Bonomo 2005)

La mayoría de estas betalactamasas no hidrolizan a las cefalosporinas de amplio espectro y no son consideradas dentro del grupo de las BLEE; no obstante,

OXA-10 hidroliza débilmente a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam provocando una reducción de la sensibilidad de muchos microorganismos a estos antibióticos. (Paterson and Bonomo 2005) Otras OXA tipo BLEE son OXA-11,-14,-16,-17,-19,-15,-18,-28,-31,-32,-35 y -45. Algunas presentan mayor acción sobre ceftazidima. Pero otras como por ejemplo OXA-17 tienen mayor acción sobre cefotaxima y cefepime que sobre ceftazidima. (Danel, Hall et al. 1999) Todas ellas se han incluido en el grupo 2 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. (Bush, Jacoby et al. 1995)

3.4.5. PER, VEB-1, BES-1 y otras BLEE

Este grupo de BLEE es poco frecuente y no presentan una relación clara con la familia de betalactamasas ya establecidas hasta el momento. En general se caracterizan por hidrolizar más eficazmente a la ceftazidima que a otros betalactámicos. (Paterson and Bonomo 2005). Entre ellas se encuentran las betalactamasas tipo PER, VEB, BES y otras.

Las BLEE tipo **PER** (*Pseudomonas* Extended Resistance) comparten solo de un 25-27% de homología con las BLEE tipo TEM y SHV. (Bauernfeind, Stemplinger et al. 1996) (Nordmann and Naas 1994)

La betalactamasa PER-1, hidroliza a penicilinas y cefalosporinas y es sensible a la inhibición por el ácido clavulánico. Inicialmente fue detectada en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Nordmann, Ronco et al. 1993) y más tarde en *Enterobacterias* y *Acinetobacter*. (Vahaboglu, Coskuncan et al. 2001)

PER-2, comparte un 86% de homología con PER-1, ha sido detectada en *S.entérica serovar Typhimurium*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, y *Vibrio cholerae*. (Bauernfeind, Stemplinger et al. 1996)

La BLEE **VEB-1**, tiene un 38% de homología con PER-1 Y PER-2. Esta betalactamasa confiere un alto nivel de resistencia a ceftazidima, cefotaxima, aztreonam y alta sensibilidad al ácido clavulánico. Se aisló por primera vez en un niño vietnamita hospitalizado en Francia (Poirel, Naas et al. 1999) Se ha detectado

en *Enterobacterias* y *Pseudomonas aeruginosa* en Tailandia (Girlich, Poirel et al. 2001)

En 1996 y 1997 se aisló en un hospital en Brasil una betalactamasa denominada **BES-1**, la cual presenta un 51% de homología con penicilinasas cromosómica de *Yersinia enterocolitica* Y56 y un 48% de homología con las betalactamasa tipo CTX-M, al igual que CTX-M presenta un alto grado de actividad frente a cefotaxima, por el contrario tiene un alto grado de actividad frente a ceftazidima y aztreonam presentando baja afinidad por tazobactam. (Bonnet, Sampaio et al. 2000)

Existe otro tipo de betalactamasa mediadas por plásmidos asociadas a la clase A las cuales han sido recientemente descubiertas (*GES*, *TLA*, *SFO*, *IBC*). Las cuales presentan una gran diversidad geográfica. (Paterson and Bonomo 2005)

GES (IBC) se ha aislado en gram-negativos como *P.aeruginosa*, *E.coli* y *K.pneumoniae*. Comparada con otras betalactamasas del grupo A presenta mayor sensibilidad a imipenem.

Sustituciones en Gly-170→Asn dentro del giro w provoca un aumento de la acción hidrolítica frente a carbapenemas. (Giakkoupi, Tzouvelekis et al. 2000) (Naas, Poirel et al. 2008)

SFO, fue descrita por primera vez en una cepa de *Enterobacter cloacae* en Japón en 1988. Presenta una acción hidrolítica mayor frente a cefotaxima que frente a ceftazidima y su acción es inhibida por clavulánico e imipenem. No presentando acción frente a cefamicinas y carbapenemas. (Naas, Poirel et al. 2008)

3.5. Epidemiología de las BLEE

La posibilidad de diseminación de las BLEE es extraordinaria, debido a que están codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual posibilita no sólo la diseminación de este mecanismo de resistencia entre distintas cepas de la misma especie sino también entre diferentes especies bacterianas.

En un principio se aislaron en pacientes hospitalizados pero en la actualidad se están detectando en infecciones adquiridas en la comunidad. (Gobernado 2005)

A partir del año 2000 se ha observado un aumento de aislamientos de cepas de *E.coli* productoras de CTX-M que afectan a pacientes de la comunidad y principalmente están implicadas en ITU. Estas cepas de *E.coli* son también resistentes a quinolonas, aminoglucósidos y cotrimoxazol. (Pérez, Endimiani et al. 2007) .

Otro aspecto importante a destacar en la epidemiología de las BLEE principalmente en cepas de *E.coli* en su presencia como flora comensal en los humanos. El tracto digestivo es el reservorio de la mayoría de los uropatógenos y la colonización gastrointestinal normalmente precede a las ITU debidas a cepas portadoras de BLEE. (Arpin, Dubois et al. 2005) Valverde y cols informan de un 11,8% de portadores fecales de cepas de *E.coli* portadoras de BLEE en pacientes hospitalizados y un 5,5% en pacientes extrahospitalarios. (Valverde, Coque et al. 2004)

3.5.1. Epidemiología global

- Europa

Los primeros casos de enterobacterias productoras de BLEE fueron detectados en Europa en concreto en Alemania e Inglaterra (1983), donde se detecto la variante SHV-2 en una cepa de *E.coli* en pacientes ingresados en UCI, pero fue en Francia donde se detecto el primer brote nosocomial en 1986, se trato de una cepa de *K. pneumoniae* con la variante TEM-3, produciéndose un aumento dramático de los casos de BLEE en los años sucesivos en todo el mundo. En 1990s en Francia del 25 al 30% de los aislamientos de *K.pneumoniae* eran portadores de BLEE, se adoptaron medidas de control lo que hizo disminuir la tasa de infecciones de *K. pneumoniae* productora de BLEE de un 19.7% en 1996 a un 7.9% en 2000. Es importante destacar que un 30.2% de los aislamientos de *Enterobacter aerogenes* fueron portadores de BLEE en el año 2000. (Paterson and Bonomo 2005) (Cantón,

Novais et al. 2008)

En 1986, en Japón se detectó la betalactamasa FEC-1 en un aislamiento de *E.coli*, la cual fue posteriormente detectada en Alemania, Argentina, Francia e Italia denominándose CTX-M. En 1991, en Turquía y Francia se detectan oxacilinasas con fenotipo similar a las BLEE, la mayoría de ellas OXA-10, la cual posteriormente ha sido detectada en todo el mundo principalmente en aislados de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacterias*. Por ultimo, dentro del grupo denominado BLEE menores como son PER, VEB, GES, TLA, BEL, BES, SFO e IBC se esta produciendo un aumento en sus aislamientos en todo el mundo. (Cantón, Novais et al. 2008) (Naas, Poirel et al. 2008)

La epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE ha sufrido cambios en los últimos años; en un principio en los años 80 y principios de los 90 las BLEE eran del tipo TEM y SHV, se detectaban fundamentalmente en *K. pneumoniae* y el origen era nosocomial y se debía a clones epidémicos, mientras que en la actualidad en la mayoría de los países, son las CTX-M las más frecuentes se aíslan principalmente en *E.coli*, son de origen comunitario y fundamentalmente se transmiten por plásmidos u otros elementos genéticos móviles. (Cantón, Novais et al. 2008)

Existe una gran diversidad geográfica dentro Europa en cuanto a la prevalencia de BLEE, encontrándonos Rusia con un 50% y Polonia con un 40%. En España un estudio realizado en 2000 muestra una prevalencia en *K. pneumoniae* y *E.coli* de 2.7% y 0.5% respectivamente. La prevalencia de BLEE en Europa es mas alta que en Estados Unidos pero mas baja que en Asia y América del Sur. (Hernández, Pascual et al. 2003) (Cantón, Novais et al. 2008)

- Norteamérica

Los primeros informes sobre organismos productores de BLEE en Estados Unidos datan de 1988. En 1989, se informan casos de infecciones producidas por variantes SHV y CTX-M en Canadá y Estados Unidos. La prevalencia de organismos productores de BLEE quizás ha estado subestimada en el pasado debido al punto

de corte establecido para la resistencia a ceftazidima el cual fue definido como una CMI $\geq 32 \mu\text{g/ml}$. o para cefotaxima CMI $\geq 64 \mu\text{g/ml}$, cuando muchos microorganismos productores de BLEE tienen CMIs entre 2 y 16 $\mu\text{g/ml}$.

En estudios realizados en el periodo 1998-2002 sobre 6101 aislamientos de *K. pneumoniae* en UCIs se obtiene un 6.1% de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Mientras que en pacientes comunitarios la tasa es 1.8% sobre 12,059 aislamientos de *K.pneumoniae* y 0.4% en *E.coli* sobre un total de 71,448 aislamientos. (Paterson and Bonomo 2005)

- América latina

Es en 1989 cuando se informa el primer aislamiento de BLEE detectado en América latina. En la actualidad América latina tiene la tasa más elevada del mundo, existiendo variaciones dentro de los países que la forman, siendo los de mayor prevalencia Brasil y Chile.

Se han informado caso de CTX-M, PER, TEM, SHV observándose un aumento de las infecciones producidas en la comunidad.

Estudios recientes obtienen para América latina la prevalencia mas alta en el mundo de aislamientos para *K. pneumoniae* portadora de BLEE con un 45.4-51.9% y para *E.coli* de un 8.5-18.1%. (Villegas, Kattan et al. 2008)

- Asia

En 1988 en China son informados aislamientos de *K.pneumoniae* portadora de SHV-2 y SHV-5. Recientes estudios realizados en China revelan tasas de producción de BLEE de un 16% en *E.coli* y un 17% en *K.pneumoniae*, siendo las BLEEs más predominantes el tipo CTX-M. Asia se considera el mayor reservorio de genes bla_{CTX-M} del mundo. (Hawkey 2008)

- África y el medio Este

Se han informado varios brotes de infecciones por organismos portadores de BLEE en África del Sur, pero no se han publicado estudios nacionales. No obstante, en 1998 y 1999 se informo una tasa de 36.1% de aislamientos de *K.pneumoniae* portadora de BLEE en un único hospital.

También han sido informados aislamientos en Arabia Saudita, Israel y otros países del medio este. (Paterson and Bonomo 2005)

- Australia

El primer informe sobre BLEE en Australia fue en una cepa de *K.pneumoniae* resistente a gentamicina. El 5% de los aislamientos de *K.pneumoniae* en hospitales australianos son portadores de BLEE. (Paterson and Bonomo 2005)

3.5.2. Infecciones nosocomiales

Las infecciones nosocomiales son uno de los temas de más preocupación desde el punto de vista de los programas para el control de la infección. Las infecciones se pueden presentar como brotes o como casos endémicos, siendo muy importante conocer si se trata del mismo clon (brote monoclonal u oligoclonal) lo cual implicaría la existencia de una transmisión de paciente a paciente. Por el contrario, las infecciones nosocomiales pueden ser debidas a microorganismos de la misma especie pero no del mismo clon (brote policlonal), el cual puede ser debido a la presión ejercida por el uso de antibióticos.

Existen numerosos estudios que utilizan métodos moleculares para el estudio de la epidemiología de las infecciones nosocomiales producidas por organismos productores de BLEE. Mas del 75% de estos estudios están dirigidos a las infecciones producidas por *Klebsiella pneumoniae*. La predilección de las BLEE por el genero *Klebsiella* no ha sido todavía bien explicada. Cabe destacar que las BLEE tipo TEM se pueden encontrar en otras especies diferentes de *Klebsiella*, siendo más frecuente en este género las BLEE tipo SHV. Casi todos los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* no productora de BLEE poseen una betalactamasa cromosómica SHV-1. Por el contrario, menos del 10% de los aislamientos de *E.coli* resistentes a ampicilina contienen SHV-1. La explicación podría ser que el genero *Klebsiella* se adapta bien al ambiente hospitalario. La *Klebsiella* sobrevive mas tiempo que otras enterobacterias en las manos y en las superficies, facilitándose de esta manera la infección cruzada dentro del hospital.

Han sido descritos brotes de organismos que pertenecían a un clon genotípicamente idénticos. Por otra parte, ha sido comprobado que la persistencia de los clones puede llegar a ser de más de 3 años. El tema se complica debido a que existen estudios que describen la diseminación clonal de al menos 5 cepas diferentes de *Klebsiella* portadoras de BLEE en la misma unidad y al mismo tiempo. En adicción, miembros de una única cepa pueden portar diferentes plásmidos. Además, las cepas genotípicamente no relacionadas pueden producir las misma BLEE debido a la transferencia mediada por plásmidos entre las especies. Por último, la misma BLEE puede ser prevalente en una particular unidad del hospital pero puede ser mediada por diferentes plásmidos. Esto podría sugerir una evolución independiente de los efectos de la presión de los antibióticos o la transferencia de los plásmidos de organismo a organismo.

Las unidades de cuidados intensivos son a menudo el foco de la aparición de BLEE en los hospitales y de infecciones producidas por cepas de *Klebsiella* multirresistentes. Además de las unidades de cuidados intensivos han sido afectados por brotes otros servicios como neurocirugía, unidad de quemados, obstetricia y ginecología, oncología y geriatría.

Ha sido bien documentada la transferencia de BLEE genotípicamente relacionadas dentro de una misma ciudad, entre ciudades y entre países. Cabe destacar dos grandes brotes, uno producido por *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE tipo SHV-4 en hospitales de Francia y Bélgica; y el otro gran brote se produjo por una cepa de *Enterobacter aerogenes* en Francia, España y Bélgica. Asimismo ha sido documentada la transferencia intercontinental.

En la encuesta nacional nosocomial, en relación a la tasa de resistencia en enterobacterias frente a los nuevos antibióticos betalactámicos, realizada en Polonia, los resultados obtenidos muestran un alto crecimiento de resistencia mediada por betalactamasas, encontrándose en 11,1% de BLEE, 40,4% en *K. pneumoniae* y un 2,5% en *E.coli*, siendo el tipo CTX-M el más predominante seguido de SHV y TEM. (Empel, Baraniak et al. 2008)

3.5.3. Infecciones adquiridas en la comunidad

En 1993 se investigaron en Francia 2500 aislamientos de *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* todos ellos procedían de pacientes no hospitalizados, lo cual permitió conocer con más precisión el porcentaje de cepas portadoras de BLEE en la comunidad. De 107 cepas de *Klebsiella pneumoniae* 5 de ellas eran portadoras de BLEE, todos los pacientes procedían de un asilo.

Por otra parte, algunos patógenos productores de diarreas en la comunidad como *Salmonella* y *Shigella* son portadores de BLEE.

En los últimos años ha habido muchos informes acerca de las infecciones o colonizaciones adquiridas en la comunidad por *E.coli* fundamentalmente produciendo ITU. Estas cepas son portadoras de BLEE (CTX-M) y con resistencia a los agentes de elección para el tratamiento de las ITU, como son trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino o gentamicina. Rodríguez-Baño estudio los factores de riesgo para las ITU por *E.coli* portadora de BLEE en pacientes no hospitalizados, siendo estos: pacientes con diabetes mellitus, previo uso de quinolonas, ITU recurrentes, previa admisión en el hospital, y ancianos. (Rodríguez-Baño, Navarro et al. 2004)

El aumento de cepas portadoras de BLEE implicadas en infecciones adquiridas en la comunidad no esta todavía claro, podría enfocarse los estudios hacia los productos alimenticios, el consumo animal de antibióticos y el frecuente contacto de la población con el sistema de salud. (Pérez, Endimiani et al. 2007)

3.5.4. Factores de riesgo implicados en la colonización e infección por organismos productores de BLEE

Dentro de los factores predisponentes para la aparición de brotes destaca el uso excesivo de antimicrobianos, principalmente de cefalosporinas de tercera generación, también se han relacionado con fluoroquinolonas, aztreonam, aminoglucósidos, cotrimoxazol y metronidazol. Parece ser que los principales

factores determinantes para la diseminación y selección de las cepas son la duración y el espectro del antibiótico utilizado.

Los grupos de pacientes más frecuentemente afectados en los brotes son: neonatos, quemados, con cáncer, trasplantados y los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos.

Existen una serie de factores de riesgo que pueden predisponer a una mayor colonización y/o infección entre los que se encuentran la duración de la hospitalización y de la estancia en UCI, la edad, la colonización gastrointestinal, ser portador de catéteres urinarios, intravasculares, de gastrostomía, yeyunostomía, la intubación oro traqueal, la hemodiálisis, la ventilación mecánica, la nutrición parenteral, la malnutrición, el desarrollo de úlceras por presión, bajo peso al nacer....., es decir es más frecuente en pacientes con enfermedad de base y factores de riesgo, con algún grado de inmunodepresión, lo cual les hace candidatos a la infección y por tanto, son tratados con antibióticos de amplio espectro, principalmente cefalosporinas y fluoroquinolonas. (Colodner 2005)

Arpin y cols establecen tres principales factores de riesgo de adquisición de BLEE en pacientes de la comunidad: antecedentes de hospitalización, antibioterapia especialmente con betalactámicos y quinolonas y colonización gastrointestinal por cepas portadoras de BLEE. (Arpin, Dubois et al. 2005) Otros autores describen además otros factores de riesgo en pacientes no hospitalizados diabetes mellitus, ITU recurrentes, edad > 60 años y sexo masculino. (Rodríguez-Baño, Navarro et al. 2004) (Colodner 2005)

3.5.5. Medidas de control de la aparición y diseminación de la infección por BLEE

Desde el punto de vista epidemiológico existen una serie de reservorios endógenos que facilitan la diseminación de la resistencia entre las diferentes especies, como son el tubo digestivo, la orofaringe, las heridas colonizadas así como termómetros, geles empleados en ecografía, sondas de oxigenoterapia, jabón

líquido, uñas postizas del personal; siendo el principal vector de la infección las manos de los profesionales.

Existen una serie de medidas que han resultado eficaces a la hora de reducir la aparición y diseminación de cepas portadoras de BLEE, como son:

1. Uso restrictivo de cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas
2. Aislamiento cutáneo ante la detección de una colonización no infección (habitación individual, uso de guantes y bata, cambio de guantes y lavado de manos con solución antiséptica entre pacientes)
3. Educación sanitaria en materia de prevención del personal.
4. Lavado exhaustivo de manos incluso con algún producto desinfectante.
5. Mejorar la detección de BLEE por parte del laboratorio.

Por el contrario hay medidas cuya eficacia es controvertida como por ejemplo la descontaminación intestinal, debido a que puede seleccionar otros microorganismos multirresistentes

3.6. Detección en el laboratorio

La mayoría de los métodos diseñados para detectar microorganismos productores de BLEE están basados en la propiedad de estas enzimas de ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas.

Lo primero es detectar fenotipos compatibles con la presencia de BLEE realizando un análisis del perfil de sensibilidad a los diferentes antimicrobianos, siguiendo los criterios habituales de lectura interpretada del antibiograma. (Livermore and Brown 2001)

Los criterios establecidos por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute 2007) definen una CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ como resistente en enterobacterias frente a ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, cefepime y aztreonam. La prevalencia real de infecciones producidas por organismos portadores de BLEE puede estar infravalorada debido a que muchas BLEE presentan CMI en el rango de 2-8 $\mu\text{g/ml}$. (Pérez, Endimiani et al.

2007)

El CLSI recomienda utilizar métodos de screening (disco-difusión, susceptibilidad antimicrobiana por dilución) seguidos de métodos de confirmación (confirmación fenotípica, doble difusión con discos)

3.6.1. Métodos de screening

Método de disco-difusión

El CLSI propone este método para screening de producción de BLEEs en *E.coli*. Se utilizan los siguientes antibióticos y se sospecha BLEE cuando el diámetro del halo de inhibición tiene los valores indicados: cefpodoxima (≤ 17 mm) ceftazidima (≤ 22 mm), aztreonam y cefotaxima con (≤ 27 mm), o ceftriaxona (≤ 25 mm). Utilizando más de uno de estos agentes se aumenta la sensibilidad.

Test de susceptibilidad antimicrobiana por dilución

El CLSI propone el método de dilución como screening para la detección de BLEE *E.coli*. Se sospecha la presencia de BLEE cuando la CMI es $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ para todos los antibióticos testados excepto cefpodoxima cuya CMI es $\geq 8 \mu\text{g/ml}$.

3.6.2. métodos de confirmación

Test de confirmación fenotípica del CLSI

El CLSI recomienda usar discos de cefalosporinas con ácido clavulánico y sin el. Una diferencia de ≥ 5 mm entre el halo de inhibición del disco de cefalosporina y su respectivo disco cefalosporina/clavulánico confirma la existencia de BLEE.

También se puede utilizar el método de microdilución en caldo, en este caso una diferencia ≥ 3 diluciones entre la CMI de la cefalosporina testada sola y con ácido clavulánico confirma la presencia de BLEE.

Técnica de doble difusión con discos

Fue descrito por Jarlier en 1988 consiste en colocar un disco de amoxicilina/clavulánico (20/10 μg) en el centro de una placa de Mueller-Hinton a una distancia de 20mm de otros discos con ceftazidima (30 μg), cefotaxima (30 μg),

ceftriaxona (30 μ g) y/o aztreonam (30 μ g). La distorsión en algún halo de inhibición pone de manifiesto la presencia de BLEE.

Esta técnica presenta una serie de limitaciones, por ejemplo en las cepas con problemas de permeabilidad o con resistencia simultánea a los inhibidores de β -lactamasas puede verse disminuida la capacidad de detección de esta prueba; asimismo existen falsos positivos en el caso de cepas hiperproductoras de SHV-1 o que presentan β -lactamasas cromosómicas sensibles a los inhibidores. Así como falsos negativos con cepas portadoras de SHV-2, SHV-3 y TEM-12. (Jarlier, Nicolas et al. 1988)

Existen una serie de **métodos comerciales** de detección de BLEE como son la técnica de E-test y métodos semiautomáticos:

Técnica de E-test

Esta técnica consiste en unas tiras de plástico impregnadas en un extremo de la tira con el antibiótico cefotaxima o cefepime con un gradiente de concentración con CMI de 0,25 a 16 μ g/ml o ceftazidima con un gradiente de concentración con CMI de 0,5 a 32 μ g/ml y el otro extremo con un gradiente de cefotaxima o ceftazidima o cefepime más una concentración constante de clavulánico 4 μ g/ml. Se sospecha la presencia de BLEE cuando el cociente de las CMI de la cefalosporina sola/cefalosporina mas clavulánico es ≥ 8 .

Métodos semiautomáticos

En la actualidad disponemos de varios métodos semiautomáticos como Vitek, Microscan, BD Phoenix System.

3.7. Resistencias asociadas

La resistencia a los antibióticos es una de las causas de mayor preocupación en los ámbitos clínicos debido a tres importantes aspectos: la aparición de resistencia a los nuevos antimicrobianos; la presencia de genes plasmídicos que codifican resistencia y pueden ser fácilmente transferidos entre especies; y el aumento de resistencias no solo en el ambiente hospitalario sino además en la comunidad

(Wiener, Quinn et al. 1999); la aparición de las BLEE constituye un problema adicional de resistencia a los antimicrobianos durante las dos últimas décadas.

El aumento de BLEE producidas por enterobacterias en estos últimos años ha generado la necesidad de reevaluar la terapia de estas infecciones. El tratamiento de las infecciones urinarias debidas a cepas productoras de BLEE presenta grandes dificultades ya que estas cepas son multirresistentes, limitando por tanto las alternativas. Son resistentes a todos los betalactámicos y un 30% a 60% de ellas también a las asociaciones de betalactámico/inhibidor de betalactamasa. Son sensibles a cefamicinas, carbapenémicos. (Gobernado 2005) (Garau 2008)

Los genes que codifican las BLEE están normalmente localizados en plásmidos conjugativos (*bla*-TEM y *bla*-SHV), mientras que otros se encuentran frecuentemente dentro de integrones como *bla*-CTX-M, *bla*-GES, *bla*-VEB-1 lo que facilita su diseminación. (Machado, Cantón et al. 2005)

La corresistencia de las cepas productoras de BLEE con antimicrobianos de otras familias y la coexistencia de mecanismos adicionales de resistencia en estas cepas supone un grave problema terapéutico.

En relación a la **coexistencia** con otros mecanismos de resistencia destacaríamos los siguientes:

- **Alteraciones de la permeabilidad y resistencia a betalactámicos**

Las cefamicinas (cefexitina, cefotetan...) no son hidrolizadas por las BLEE, por lo que podrían constituir una opción para el tratamiento de las infecciones producidas por cepas productoras de BLEE. (Paterson and Bonomo 2005). Pero otros autores observan que la pérdida o modificación de las porinas en cepas productoras de BLEE causan resistencia a cefexitina.

En el caso de los carbapenemas estos son activos frente a cepas productoras de BLEE e incluso cuando también existe pérdida de porinas, aunque en la actualidad se han encontrado cepas con CMI's elevadas para meropenem.

- **Hiperproducción de betalactamasas de amplio espectro (TEM-1)** y otras betalactamasas (como AmpC) asociadas a alteraciones en la permeabilidad puede producir resistencia a inhibidores como amoxicilina/clavulánico.

En relación a la **corresistencia** con otros grupos de antimicrobianos, numerosos trabajos demuestran que las cepas productoras de BLEE son más resistentes a quinolonas, amino glucósidos y cotrimoxazol que las cepas no productoras.

- **Resistencia a quinolonas**

Múltiples estudios demuestran que las cepas productoras de BLEE son más resistentes a quinolonas, lo cual puede ser debido a mecanismos de tipo cromosómico (alteración en la diana del fármaco, superproducción de bombas de expulsión activas y pérdida de porinas) y producción de proteínas mediadas por plásmidos de la familia Qnr (QnrA, QnrB, QnrS)

1. Resistencia cromosómica

1.1. Alteración en la diana del fármaco

Mutaciones en los genes que codifican la DNA girasa y la topoisomerasa IV modifican la diana del fármaco. Se ha demostrado que en bacterias gramnegativas, la primera mutación ocurre en el gen *gyr A* y las mutaciones en los genes *parC* y *parE* tienen lugar tras las acontecidas en los genes de la girasa. Las cepas con una sensibilidad reducida a quinolonas tienen al menos una mutación en *gyrA* y son resistentes a ácido nalidíxico. Para adquirir un mayor nivel de resistencia, se necesita una segunda mutación en *gyrA* y/o la adquisición de una mutación en *parC*.

1.2. Pérdida de permeabilidad

La alteración en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, disminuye la entrada del fármaco en la célula. Esto es debido a mutaciones en los genes estructurales o reguladores de los canales de porinas. En *E.coli* los genes son *ompC* y *ompF*

1.3. Bombas de transporte activas

La expulsión del antibacteriano desde el medio intracelular al extracelular mediante transportadores endógenos activos, es otro de los mecanismos que causan resistencia a quinolonas. En *E.coli* este sistema de transporte, denominado AcrAB, es una bomba de flujo multifármaco que extrae de la célula una variedad de antibióticos, incluidas las quinolonas.

2. Resistencia mediada por plásmidos

La resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR) fue descrita por primera vez en 1998 en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* en EEUU. Desde entonces, han sido descritos al menos tres mecanismos de resistencia: proteínas de la familia Qnr (QnrA, QnrB, QnrS), una enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC (6')-Ib-cr, y una bomba eflujo QepA. Los tres han sido identificados en los cinco continentes en diferentes especies de enterobacterias, fundamentalmente en aislamientos nosocomiales y comunitarios de *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*, *Salmonella spp.*, y *Enterobacter spp.* (Poirel, Cattoir et al. 2008). Aunque los PMQR confieren sólo bajo niveles de resistencia a quinolonas y/o fluoroquinolonas, su existencia facilita la selección de mutaciones cromosómicas adicionales de alto nivel de resistencia.

La familia Qnr, el primer tipo de PMQR descrito, fue la proteína Qnr (más tarde llamada QnrA), y posteriormente fueron descubiertas en enterobacterias otras dos QnrB y QnrS, que comparten un 40% y un 59% de identidad aminoacídica, respectivamente, con QnrA. Todas estas proteínas pueden unirse directamente a las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV, y las protege de la inhibición por ciprofloxacino (Poirel, Cattoir et al. 2008)

Se han identificado en diversos aislamientos clínicos, hasta seis variantes de *qnrA* (*qnrA1*, *qnrA2*, *qnrA3*, *qnrA4*, *qnrA5*, *qnrA6*), cinco variantes de *qnrB* (*qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB3*, *qnrB4* y *qnrB5*) y dos variantes de *qnrS* (*qnrS1*, *qnrS2*). Qnr pertenece a una familia de pentapéptidos repetidos, de la que se conocen hasta el

momento más de 90 miembros.

De acuerdo con los puntos de corte del CLSI, Qnr solo proporciona resistencia al ácido nalidíxico, pero no a fluoroquinolonas (Mammeri, Van De Loo et al. 2005). Aunque la resistencia a quinolonas conferida por plásmidos que contienen el gen *qnr* es de bajo nivel, el nivel de resistencia a ciprofloxacino es similar o más alto que el conferido por mutaciones simples en el gen *gyrA*. Se ha visto además, que la resistencia fenotípica es estable y *qnr* facilita la selección de mutaciones cromosómicas adicionales bajo la exposición de quinolonas (Wang, Tran et al. 2003) permitiendo la aparición de alta resistencia.

- La **resistencia a amino glucósidos** esta relacionada con la producción de diferentes enzimas modificadores de amino glucósidos codificados por genes incluidos en integrones.
- También se han descrito más resistencia frente a **tetraciclinas y cotrimoxazol**.

En el tratamiento de las infecciones producidas por microorganismos portadores de BLEE es importante que el clínico conozca la implicación de estas infecciones cuando recibe el informe del laboratorio. (Peterson 2008)

Objetivos

En el momento de plantearnos el trabajo, las infecciones por *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productores de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) eran un problema en el hospital. Algunos datos empezaban a sugerir que las infecciones por *E.coli* productor de BLEE también podían ser un problema fuera del hospital.

E. coli es la principal causa de infección del tracto urinario (ITU) tanto en pacientes hospitalizados como en las infecciones de la comunidad, dónde se aísla en un porcentaje aún mayor.

Como la resistencia a los betalactámicos podía llevar al uso de otros antimicrobianos, nos pareció importante saber qué ocurre con los antimicrobianos habitualmente utilizados para el tratamiento de las ITU en estos *E.coli* productores de BLEE, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad.

El objetivo general de nuestro trabajo fue conocer mejor estos *E.coli* productores de BLEE desde el punto de vista microbiológico para aprender a detectarlos y a caracterizarlos así como a determinar su fenotipo de resistencia a los antibióticos betalactámicos así como a los de otras familias utilizadas en el tratamiento de la infección urinaria. Dado que las fluoroquinolonas han sido de gran utilidad en el tratamiento de las ITU, determinaremos su resistencia y si ésta supone un problema añadido en nuestras cepas.

Por ultimo, nos planteamos analizar algunos aspectos de su epidemiología, como su procedencia y su variabilidad genética.

De forma específica, el presente estudio se planteó con los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la prevalencia de *E. coli* productores de BLEE entre los aislados procedentes de los urocultivos realizados durante un año en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos.

- 2) Evaluar la capacidad de detección fenotípica e identificación presuntiva de BLEE que aplicamos en el momento actual.
- 3) Definir cualitativa y cuantitativamente los perfiles de resistencia a betalactámicos.
- 4) Determinar los tipos de betalactamasa mas frecuentes en nuestros aislados y establecer los fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos conferido por cada grupo de enzimas.
- 5) Caracterizar a nivel molecular aislados representativos de cada uno de los tipos.
- 6) Establecer los perfiles de resistencia asociados, esto es, la resistencia a los antibióticos no betalactámicos utilizados en el tratamiento de la infección urinaria encontrada en estas cepas y valorar la actividad de nuevos antibióticos como ertapenem y tigeciclina.
- 7) Identificar las cepas resistentes a fluoroquinolonas y determinar en ellas la presencia de los genes de resistencia a quinolonas de codificación plasmídica.
- 8) Establecer las posibles relaciones clonales de las cepas.
- 9) Relacionar los datos epidemiológicos de los pacientes que presentaron una infección urinaria con los diferentes tipos de BLEE.

Material y Métodos

1. Aislados clínicos

En el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos se aislaron un total de 5.053 *E.coli* procedentes de muestras de orina recibidas durante el año 2005.

Los aislamientos clínicos fueron identificados usando los paneles del sistema Wider (Soria Melguizo, S.A. Madrid); se revisaron los 5053 antibiogramas de *E.coli* realizados con este sistema y se seleccionaron los aislados con concentración mínima inhibitoria (CMI) igual o mayores a 2 µg/ml para cefotaxima, ceftazidima y/o cefepima en los que "el experto" del sistema indicaba "posible productora de BLEA (BLEE)". Se seleccionaron 198 cepas con estas características.

Del volante adjunto se recopilaron los siguientes datos: origen de la muestra (ambulatoria u hospitalaria), servicio de procedencia (en las del hospital), sexo y edad del paciente, así como fecha y número del aislamiento en el servicio de Microbiología.

2. Métodos de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos

2.1. Método de dilución en agar

Esta técnica se utilizó para la confirmación fenotípica de BLEE según el método del CLSI así como para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las cepas aisladas a los antimicrobianos betalactámicos y no betalactámicos, siguiendo los métodos y criterios establecidos por el CLSI. (NCCLS 2000)

Se prepararon 12 diluciones al doble para cada uno de los antibióticos estudiados. Se utilizó como medio de cultivo Mueller-Hinton agar. El inóculo se

realizó mediante una suspensión en solución salina (NaCl 0,9%), de cada una de las cepas, de una turbidez de 0,5 de la escala de Mc Farland lo que equivale a 10^8 UFC/ml. Se diluyó para depositar 10^5 UFC sobre la placa, mediante el replicador de Steers.

Las placas inoculadas se incubaron a 35°C 24 h. Se definió la CMI como la menor concentración del antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible para cada cepa y antibiótico, no considerando crecimiento la aparición de colonias aisladas ni de un velo débil. Los antibióticos betalactámicos y no betalactámicos estudiados con sus solventes, diluyentes y la casa comercial que los proporcionó se muestran en las Tablas 5 y 6 respectivamente.

Las concentraciones críticas empleadas para definir las categorías de sensibilidad fueron las recomendadas por el CLSI para Enterobacterias (CLSI 2007)(Tablas 7 y 8)

Se utilizaron como cepas control: *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Tabla 5.: Solventes, diluyentes y casa comercial de los antibióticos betalactámicos estudiados.

Antibióticos betalactámicos	Solvente	Diluyente	Casa comercial
Amoxicilina/clavulánico	Buffer fosfato pH 6 0.1M	Buffer fosfato pH 6 0.1M	GSK
Aztreonam	Solución saturada de Bicarbonato sódico	Agua	Sigma
Cefoxitina	Agua	Agua	Merck
Ceftazidima	Carbonato sódico	Agua	GSK
Cefotaxima	Agua	Agua	Aventis
Cefepima	Buffer fosfato pH 6 0.1M	Buffer fosfato pH 6 0.1M	Merk
Ertapenem	Buffer fosfato pH 7.2 0.01M	Buffer fosfato pH 7.2 0.01M	Merck
Imipenem	Buffer fosfato pH 7.2 0.01M	Buffer fosfato pH 7.2 0.01M	Merck

Tabla 6.: Solventes, diluyentes y casa comercial de los antibióticos no betalactámicos estudiados

Antibióticos no betalactámicos	Solvente	Diluyente	Casa comercial
Ciprofloxacino	Agua	Agua	Bayer
Fosfomicina ^a	Agua	Agua	Zambón
Gentamicina	Agua	Agua	Sigma
Nitrofurantoína	Buffer fosfato pH 8 0.1M	Buffer fosfato pH 8 0.1M	Sigma
Tetraciclina	Agua	Agua	Sigma
Tigeciclina	Agua	Agua	Wyeth

^a El medio se suplementó con glucosa-6-fosfato (25mg/L)

Tabla 7.: Concentraciones críticas aplicadas en el estudio de los antibióticos betalactámicos

Antibióticos betalactámicos	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Amoxicilina/clavulánico	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
Aztreonam	≤ 8	16	≥ 32
Cefoxitina	≤ 8	16	≥ 32
Ceftazidima	≤ 8	16	≥ 32
Cefotaxima	≤ 8	16-32	≥ 64
Cefepima	≤ 8	16	≥ 32
Ertapenem	≤ 2	4	≥ 8
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16

Tabla 8.: Concentraciones críticas aplicadas en el estudio de los antibióticos no betalactámicos

Antibióticos no betalactámicos	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16
Tigeciclina	≤ 2	4	≥ 8
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4
Fosfomicina	≤ 64	128	≥ 256
Nitrofurantoína	≤ 32	64	≥ 128

2.2. Método del Épsilon-test (E-test)

Para la determinación de la sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol utilizamos la técnica de difusión en placa con las tiras del Épsilon-Test (E-test) (AB Biodisk, Solna, Suecia) (Brown and Brown 1991)

Utilizamos placas convencionales con medio Mueller-Hinton. El inóculo se preparó a partir de 3 colonias suspendidas en un tubo con solución salina, ajustando la turbidez al 0,5 de la escala de Mcfarland. Las placas se inocularon con torunda estéril, siguiendo las instrucciones del CLSI, para el método de difusión con disco (NCCLS 2000). Posteriormente depositamos la tira con antibiótico sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron 18 h a 35° C. Consideramos CMI el punto de intersección entre el crecimiento bacteriano y la tira de E-Test. En la tabla 9 queda reflejada la concentración crítica aplicada para el estudio.

Tabla 9.: Concentración crítica aplicada en el estudio de Trimetoprim-sulfametoxazol

Antibióticos no betalactámicos	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Trimetoprim-sulfametoxazol	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$

3. Pruebas fenotípicas de confirmación de BLEE

3.1. Test de sinergia de doble disco.

Para confirmar de forma fenotípica la presencia de BLEE utilizamos en primer lugar el test de sinergia de doble disco descrito por Jarlier et al. (Jarlier, Nicolas et al. 1988)

Se basa en la utilización de inhibidores de betalactamasas en un antibiograma convencional.

Se realizó por difusión en agar utilizando una placa de Mueller-Hinton (BioMérieux, Marcy - l'Etoile. Francia) la cual se inocula con una suspensión bacteriana ajustada al patrón 0,5 de la escala de Mc Farland. Sobre ella se colocaron los discos (Becton Dickinson) de carga estándar (30 μg) de cefotaxima y ceftazidima a una distancia de 20 mm (de centro a centro) de un disco de

amoxicilina /ácido clavulánico (20/10 mg) colocado en el centro. Las placas se incubaron a 37°C 24 horas.

Se consideró sinergia positiva cuando se observó una ampliación o distorsión del halo de inhibición de cefotaxima y/o ceftazidima en la zona de intersección con amoxicilina/clavulánico.

3.2. Prueba confirmatoria para BLEE del CLSI

Se determinaron las CMI de ceftazidima y cefotaxima solas y en combinación con 4 µg/ml de ácido clavulánico.

Se consideraron productoras de BLEE las cepas que presentaron una disminución de la CMI igual o mayor a 3 concentraciones al doble para cefotaxima y/o ceftazidima en combinación con clavulánico con respecto a la CMI del antibiótico solo. (CLSI 2007)

Se determinaron además las CMI de aztreonam y cefepima solas y en combinación con 4 µg/ml de ácido clavulánico.

4. Determinación del punto isoeléctrico

4.1. Obtención del extracto crudo enzimático

Las betalactamasas se extraen mediante lisis celular por el procedimiento de sonicación, obteniéndose un material que corresponde a todo el contenido proteico, incluyendo a las betalactamasas, es lo que denominamos extracto crudo enzimático.

Realizamos una suspensión de una colonia de cada aislado de *E.coli* en 4 ml de Mueller Hinton caldo en un tubo Falcón e incubamos con agitación (50 rpm) en baño María a 37°C toda la noche. Con el fin de obtener colonias en fase exponencial, añadimos 35 ml de medio fresco a los 4 ml crecidos e incubamos en las mismas condiciones anteriores 120 minutos. Centrifugamos 15 minutos a 3000 rpm. Decantamos y lavamos con 10 ml de PBS. Volvemos a centrifugar 20 minutos a

3000 rpm. Decantamos. Queda el pellet, que puede congelarse seco hasta que se vaya a sonicar.

Realizamos la sonicación en frío, con hielo picado para evitar la desnaturalización proteica. Resuspendemos la bacteria en 1,5 ml de PBS. Pasamos a un tubo eppendorf. Utilizamos el sonicador (Sonifier B-12. Branson Sonic Power Company. Dambury. Connecticut) en la posición 3. Hicimos 3 ciclos de 15 segundos.

El sonicado se clarificó por centrifugación 2 minutos a 15.000 rpm en centrifuga Eppendorf.

Confirmamos la presencia de una betalactamasa en la cepa estudiada por aparición de una coloración rojiza al añadir 5 μ l de nitrocefín (Oxoid, Basingstoke, UK) a una concentración de 500 μ g por ml, a 5 μ l del sobrenadante obtenido.

4.2. Isoelectroenfoque

El IEF es una técnica de alta resolución para la separación de las proteínas en función de sus puntos isoeléctricos. Se trata de un tipo de electroforesis. Se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH. Las moléculas anfotéricas, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH.

La región del ánodo es ácida y la del cátodo es alcalina. Entre ambos se establece un gradiente de pH tal que las moléculas que se han de separar tengan su punto isoeléctrico dentro del rango. Las sustancias que inicialmente se encuentran en regiones de pH inferior a su punto isoeléctrico estarán cargadas positivamente y migraran hacia el cátodo, mientras aquéllas que se encuentran en medios con pH más altos que su punto isoeléctrico tendrán carga negativa y migrarán hacia el ánodo. La migración las conducirá a una región donde el pH coincidirá con su punto isoeléctrico, tendrán una carga neta nula y se detendrán. De esta forma las moléculas anfotéricas se sitúan en estrechas bandas donde coincide su punto isoeléctrico con el pH. (Huovinen 1988)

Se utilizaron geles PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia, Upsala, Suecia) que cubren un

rango de pH de 3 a 9, son geles de poliacrilamida conteniendo Pharmalyte portador de anfolitos.

El isoelectroenfoco de las muestras se realizó según la técnica descrita por Houvinen (Huovinen 1988) utilizando el aparato denominado Phastsystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia) siguiendo el protocolo del fabricante.

El revelado se efectuó añadiendo 20-40 μ l de una solución de nitrocefín (500 μ g/ml) a la superficie del gel, que dará lugar a la aparición de bandas a distintas alturas dependiendo de su pI.

Para la determinación de los puntos isoeléctricos se utilizaron las siguientes cepas control de GEMARA (Grupo de estudio de los mecanismos de acción y resistencia a los antimicrobianos de la SEIMC) con pI conocidos (Tabla 10).

Tabla 10.: Cepas control utilizadas para la determinación del punto isoeléctrico

Nº de cepa	Tipo de BLEE	pI
CCG-01	<i>E.coli</i> productor de β -lactamasa de amplio espectro clase A (TEM-1) + BLEE (CTX-M14)	5,4 8,1
CCG-02	<i>E.coli</i> productor de β -lactamasa de amplio espectro clase A (TEM-1) + BLEE (CTX-M9)	5,4 8,0
CCG-03	<i>E.coli</i> productor de BLEE (CTX-M10)	8,1
CCG-04	<i>E.coli</i> productor de β -lactamasa de amplio espectro clase A (TEM-1) + BLEE (SHV-12)	5,4 8,2

Los valores obtenidos de IEF fueron correlacionados como betalactamasas TEM, SHV, CTX-M, OXA y otras en (G. Jacoby and K. Bush, amino acid sequences for TEM, SHV y OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β -lactamasas <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

5. Estudios genéticos

5.1. Extracción de DNA

El DNA genómico se extrajo mediante las columnas de purificación de DNA QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

Las células son lisadas durante una corta incubación con Proteinasa K en presencia de una sal caotrópica (CLH de guanidina) y los ácidos nucleicos quedan retenidos en la fibra de vidrio del filtro de la columna.

Los ácidos nucleicos unidos son tratados con el fin de eliminar los inhibidores contaminantes y finalmente son recuperados usando un tampón de elución.

5.2. Cálculo de la concentración de DNA

Tras la extracción, se determinó la concentración de DNA de cada una de las muestras. Para ello se midió la absorbancia a 260nm en espectrofotómetro (Ultrospec[®] 1000, Amersham Pharmacia Biotech) de cada uno de los extraídos. Los cálculos de la concentración de ADN se realizaron teniendo en cuenta que 1.0 unidad de A_{260nm} de DNA de doble cadena equivale a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

5.3. Amplificación de los genes que codifican para BLEE

Para la amplificación de los genes *bla*_{-TEM}, *bla*_{-SHV}, *bla*_{-CTX-M} se utilizaron los iniciadores que se muestran en la Tabla 11

Tabla 11.: Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación

Gen	Iniciador	Secuencia del iniciador (5'→3')	Tamaño
<i>bla</i> -TEM	BLAT-A	TAA AAT TCT TGA AGA CG	1074 pb
	BLAT-B	TTA CCA ATG CTT AAT CA	
<i>bla</i> -SHV	SHV1	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TGT	900 pb
	SHV2	TTA GCG TTG CCA GTG CTC	
<i>bla</i> -CTX-M	CTX-M consensus F	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA*	543 pb
	CTX-M consensus R	CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG*	
	CTX-M9F	GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG	856 pb
	CTX-M9 R	ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC	

*S= G o C; Y=C o T; R= A o G

Para cada reacción de amplificación las concentraciones finales en la mezcla de reacción fueron: 200-400 ng de DNA diana, 1X de *buffer* 10X (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM de KCl), 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 μM de cada oligonucleótido, 200 μM de los dNTPs, 0.1% de Tritón X100 y 2.5 U de Taq polimerasa. El volumen, hasta 50 μl, se completó con agua destilada estéril.

La amplificación se realizó en un termociclador de Perkin Elmer y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

bla-TEM

3 minutos de desnaturalización inicial a 93°C, 30 ciclos (desnaturalización 1 minuto a 93°C, hibridación 1 minuto a 40°C y extensión 1 minuto a 72°C), seguidos de una extensión final de 5 minutos a 72°C

bla-SHV

3 minutos de desnaturalización inicial a 93°C, 35 ciclos (desnaturalización 1 minuto a 93°C, hibridación 1 minuto y 30 segundos a 58°C y extensión 1 minuto a 72°C), seguidos de una extensión final de 5 minutos a 72°C

*bla*_{-CTX-M}

En el caso de los iniciadores *consensus* las condiciones fueron: 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos (desnaturalización 1 minuto a 94°C, hibridación 1 minuto a 50°C y extensión 1 minuto a 72°C), seguidos de una extensión final de 5 minutos a 72°C

En el caso de la amplificación con los iniciadores de *bla*_{-CTX-M9} las condiciones fueron: 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos (desnaturalización 1 minuto a 94°C, hibridación 1 minuto a 62°C y extensión 1 minuto a 72°C), seguidos de una extensión final de 5 minutos a 72°C.

5.4. Amplificación de los genes de resistencia a quinolonas

Para la amplificación y detección de los genes que confieren resistencia cromosómica (*gyrA* y *parC*) y plasmídica (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) a las fluoroquinolonas se utilizó la PCR.

Como cepa control para el gen *qnrA* utilizamos una cepa de *Klebsiella pneumoniae* cedida por José Manuel Rodríguez Martínez de la facultad de Medicina de la universidad de Sevilla (España). Las cepas control para los genes *qnrB* y *qnrS* fueron cedidas amablemente por Huís Martínez-Martínez del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander (España): Ref-137: *qnrB* (*E.coli*), 06/2296: *qnr S* (*K. pneumoniae*).

Los genes *gyrA*, *parC*, *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* fueron amplificados con los primers que se detallan en la tabla 12

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *gyrA* fueron descritos por (McDonald, Chen et al. 2001) los del gen *parC* por Komp (Lindgren 2003) y los de los genes *qnr* fueron descritos por (Cattoir, Poirel et al. 2007) (Jacoby, Walsh et al. 2006)

Tabla 12.: Primers utilizados en la distintas PCRs.

Gen	Nombre de los primers	Secuencia del primer (5' → 3')	Tamaño fragmento (pb)
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> 6	CGACCTTGCGAGAGAAAT	626
	<i>gyrA</i> 631R	GTTCCATCAGCCCTTCAA	
<i>parC</i>	<i>parC</i> F43	AGCGCCTTGCGTACATGAAT	964
	<i>parC</i> R981	GTGGTAGCGAAGAGGTGGTT	
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> f	GGGTATGGATATTATTGATAAAG	658
	<i>qnrA</i> r	CTAATCCGGCAGCACTATTA	
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> f	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264
	<i>qnrB</i> r	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA	
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> f	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
	<i>qnrS</i> r	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	

M: A ó C, H: A ó C o T, Y: C ó T.

Las amplificaciones de *gyrA*, *parC*, *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* fueron realizadas en un volumen final de 25 µl conteniendo: 1 µM de cada primer, 200 µM de dNTPs, 1x del buffer de reacción (con 1,5 mM de Mg Cl₂), 1 U de Taq polimerasa (AmpliTaq DNA Polymerase, Roche Molecular Systems), y 150 ng de DNA.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador *Perkin Elmer DNA Thermal Cycler* y las condiciones fueron las siguientes:

gyrA: Desnaturalización durante 5 min. a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C 1 min.), annealing (60°C 1 min.) y extensión (72°C 1 min.), seguido de un ciclo final de 5 min. a 72°C.

parC: Desnaturalización durante 5 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (95°C 1 min.), annealing (53°C 1 min.) y extensión (72°C 1 min.), seguido de un ciclo final de 5 min. a 72°C.

qnrA: Desnaturalización durante 5 min. a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C 1 min.), annealing (54,5°C 1 min.) y extensión (72°C 1 min.), seguido de un ciclo final de 5 min. a 72°C.

qnrB: Desnaturalización durante 3 min. a 94°C, seguido de 32 ciclos de desnaturalización (94°C 45"), annealing (53°C 45") y extensión (72°C 1 min.), y por último un ciclo final de 10 min. a 72 °C.

qnrS: Desnaturalización durante 10 min. a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (95°C 1 min.), annealing (57°C 1 min.) y extensión (72°C 1 min.), y por último un ciclo final de 10 min. a 72 °C.

5.5. Detección de los amplificados por electroforesis en geles de agarosa.

Los productos obtenidos tras la amplificación se analizaron mediante electroforesis, utilizando geles de agarosa al 1.5% en tampón T.A.E. (Tris-Acetato EDTA) 1X con Bromuro de Etidio. La visualización de los productos amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta. En cada reacción de PCR se incluyeron un control positivo de amplificación y un control negativo.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron 100 pb y 100-2000 pb (Dominion. MBL).

Para la detección y caracterización de las betalactamasas por amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en el isoelectroenfoque para la determinación de los puntos isoeléctricos se utilizaron las mismas cepas control de GEMARA (Grupo de estudio de los mecanismos de acción y resistencia a los antimicrobianos de la SEIMC)

5.6. Secuenciación de los productos de PCR

Un paso previo a la secuenciación de los productos amplificados, fue su purificación mediante el kit comercial ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland,

USA), para hidrolizar los dNTPs y oligonucleótidos sin consumir, que pueden interferir en la reacción de secuenciación posterior. Este kit contiene dos enzimas hidrolíticas: una exonucleasa que degrada los primers residuales, y una fosfatasa alcalina que degrada los dNTPs remanentes tras la reacción de PCR.

Una vez purificados se determinaron las secuencias de nucleótidos en ambas direcciones utilizando un secuenciador automático (ABI PRISM 3100 v.3.7 Applied BioSystems).

6. Análisis epidemiológico de las cepas mediante (RAPD)

La técnica de RAPD (random amplified polymorphic DNA) consiste en una amplificación aleatoria de fragmentos de DNA cromosómico mediante el empleo de iniciadores arbitrarios en una reacción en cadena de la polimerasa. El objetivo es determinar la relación epidemiológica y el grado de polimorfismo de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

Para la amplificación se emplearon los tubos Ready to go (Amersham Biosciences) que contienen buffer de alta calidad, nucleótidos y DNA polimerasa recombinante, de manera que solo el DNA y el cebador deben ser adicionados por lo que se reduce significativamente la posibilidad de errores y aumenta la reproducibilidad.

La secuencia de nucleótidos utilizada como iniciador fue:

ERIC-2: 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'

Se utilizaron 50 ng del DNA y una concentración final de cebador 0,2 μ M.

Programa de amplificación para el ensayo RAPD

Desnaturalización	94° c	1 minuto	45 ciclos
Hibridación	45°C	1 minuto	
Elongación	74°C	1 minuto	

El análisis de los fragmentos obtenidos se realizó por electroforesis en geles de agarosa, con buffer T.A.E. Aplicamos una corriente de 12 mV toda la noche. Revelamos con luz ultravioleta y lo fotografiamos con cámara Polaroid. Para uno de los geles utilizamos el sistema de tratamiento de la imagen de Biorad.

7. Cálculos estadísticos

Para la recogida y manejo de datos utilizamos el programa Microsoft Access. La comparación de la prevalencia a la resistencia a los antibióticos entre nuestras cepas y el grupo control se realizó mediante el valor de $p \leq 0.01$ y cuando fue necesario el test exacto de Fisher. Como medidas de asociación se calculó la odds ratio (OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95%. En todas las comparaciones se realizó la hipótesis nula con una $p < 0.01$. El análisis estadístico se realizó con el programa informático EpiInfo versión 6.04.

Resultados

1. Aislados clínicos

En el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos se aislaron un total de 5.053 *E.coli* procedentes de muestras de orina recibidas durante el año 2005.

Los aislamientos clínicos fueron identificados usando los paneles del sistema Wider (Soria Melguizo, S.A. Madrid); se revisaron los 5053 antibiogramas de *E.coli* realizados con este sistema y se seleccionaron los aislados con concentración mínima inhibitoria (CMI) igual o mayor a 2 µg/ml para cefotaxima, ceftazidima y/o cefepima en los que "el experto" del sistema indicaba "posible productora de BLEA (BLEE)". Se seleccionaron 198 cepas con estas características, lo que supone una prevalencia del 3,9%.

A estas 198 cepas se les realizaron pruebas fenotípicas de confirmación (test de sinergia de doble disco y prueba confirmatoria para BLEE del CLSI) confirmándose la producción de BLEE en 189 cepas lo que supone una prevalencia del 3,7%. Se eliminaron las 9 cepas que dieron ambas pruebas confirmatorias negativas.

2. Pruebas fenotípicas de confirmación de BLEE

2.1. Test de sinergia de doble disco

Para confirmar de forma fenotípica la presencia de BLEE utilizamos en primer lugar el test de sinergia de doble disco. Dicho test fue positivo en el 100% de las cepas estudiadas (189/189).

En las figuras 7, 8 y 9 se muestran los test de sinergia para las cepas nº 163, 135 y 146.



Figura 7.: Test de sinergia de doble disco cepa n° 163: izquierda, ceftazidima 30 μ g; centro amoxicilina+clavulánico 20 + 10 μ g; derecha, cefotaxima 30 μ g. El microorganismo es una cepa de *E.coli* productora de una BLEE del tipo SHV-12 con qnrB-19.

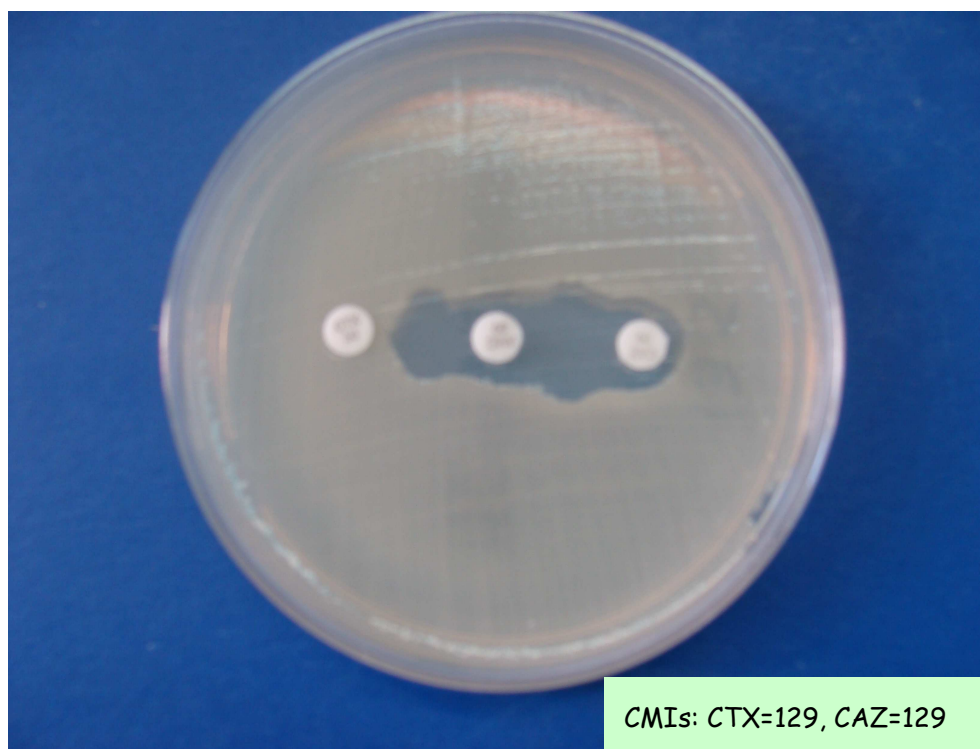


Figura 8.: Test de sinergia de doble disco cepa n° 135: izquierda, ceftazidima 30 μ g; centro amoxicilina+clavulánico 20 + 10 μ g; derecha, cefotaxima 30 μ g. El microorganismo es una cepa de *E.coli* productora de BLEE del tipo TEM-24 y CTX-M-15.

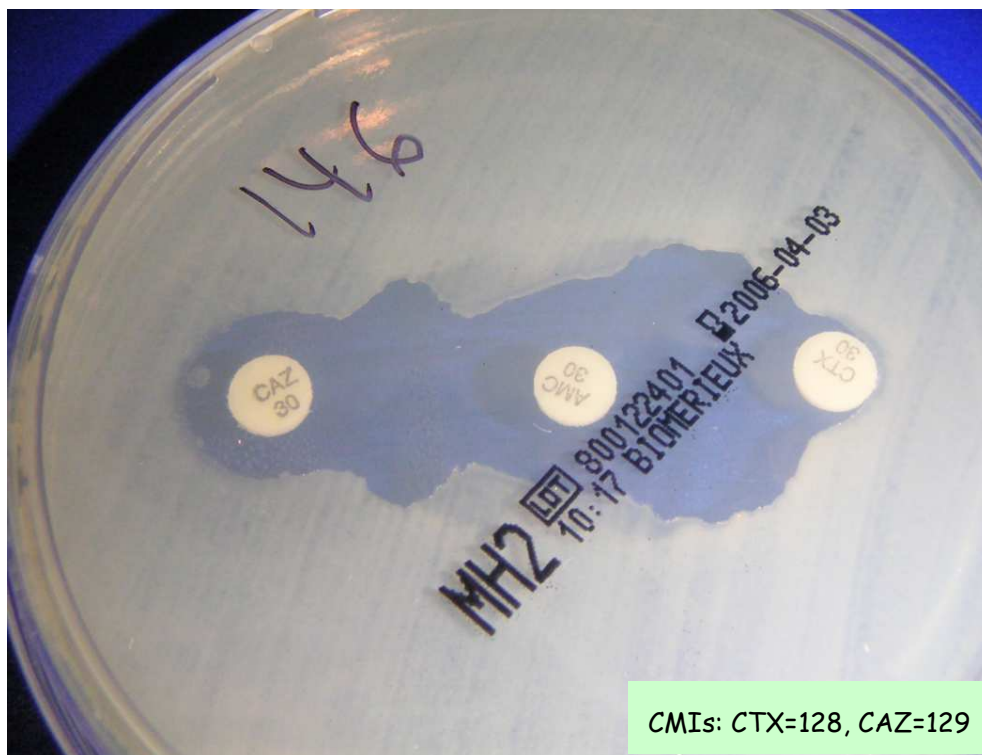


Figura 9.: Test de sinergia de doble disco cepa nº 146: izquierda, ceftazidima 30 µg; centro amoxicilina+clavulánico 20 + 10 µg; derecha, cefotaxima 30 µg. El microorganismo es una cepa de *E.coli* productora de BLEE de los tipos TEM -1 y CTX-M-15.

2.2. Prueba confirmatoria para BLEE del CLSI

Se determinaron las CMIs de ceftazidima y cefotaxima solas y en combinación con 4 µg/ml de ácido clavulánico.

La tabla 13 muestra los resultados del nº de cepas con cada valor de CMI y % acumulativos obtenidos frente a los siguientes antibióticos betalactámicos: cefotaxima, ceftazidima, solas y con ácido clavulánico.

Tabla 13.: N° de cepas con cada valor de CMI y % acumulativos.-

Antibióticos betalactámicos		Valores de CMI													
		≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Cefotaxima	n° de cepas						12	19	18	42	32	20	19	17	10
	% acumul.						6,3%	16,4%	25,9%	48,1%	65,0%	75,6%	85,7%	94,7%	100%
Cefotaxima-clavulánico	n° de cepas	34	84	53	16	1			1						
	% acumul.	17,9%	62,4%	90,4%	98,9%	99,4%	99,4%	99,4%	100%						
Ceftazidima	n° de cepas						3	27	38	32	3	8	26	31	21
	% acumul.						1,5%	15,8%	35,9%	52,9%	54,4%	58,7%	72,4%	88,8%	100%
Ceftazidima-clavulánico	n° de cepas			1	4	42	91	33	16	1	1				
	% acumul.			0,5%	2,6%	24,8%	73,0%	90,4%	98,9%	99,4%	100%				

El 100% (189/189) de las cepas presentaron una disminución de la CMI igual o mayor a 3 concentraciones al doble para cefotaxima-clavulánico con respecto a cefotaxima sola. Por lo tanto se confirma la presencia de BLEE.

El 62,4% (118/189) de las cepas presentaron una disminución de la CMI igual o mayor a 3 concentraciones al doble para ceftazidima-clavulánico con respecto a ceftazidima sola. En la tabla 14 vemos la concordancia entre el confirmatorio de ambas cefalosporinas.

Tabla 14.- Concordancia entre el confirmatorio con cefotaxima y ceftazidima

		CAZ vs. CAZ/clav.		
		≥3 diluciones	<3 diluciones	Total
CTX vs. CTX/clav.	≥3 diluciones	118	71	189
	<3 diluciones	0	0	0
	Total	118	71	189

Determinamos además las CMIs de cefepima y aztreonam solas y en combinación con 4 µg/ml de ácido clavulánico. La tabla 15 muestra los resultados del nº de cepas con cada valor de CMI y los % acumulativos obtenidos.

Tabla 15.: N° de cepas con cada valor de CMI y % acumulativos.-

Antibióticos betalactámicos		VALORES DE CMI													
		≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Aztreonam	n° de cepas				1	1	21	33	24	16	24	31	25	12	1
	% acumul.				0,5%	1,0%	12,1%	29,6%	42,3%	50,7%	63,4%	79,8%	93,1%	99,4%	100%
Aztreonam- clavulánico	n° de cepas	41	71	63	12	2									
	% acumul.	21,6%	59,2%	92,5%	98,9%	100%									
Cefepima	n° de cepas		2	4	9	22	19	29	34	27	23	14	5	1	
	% acumul.		1,0%	3,1%	7,9%	19,5%	29,6%	44,9%	62,9%	77,2%	89,4%	96,8%	99,4%	100%	
Cefepima- clavulánico	n° de cepas	109	51	28	1										
	% acumul.	57,6%	84,6%	99,4%	100%										

El 100% (189/189) de las cepas presentaron una disminución de la CMI igual o mayor a 3 concentraciones al doble para aztreonam-clavulánico con respecto a aztreonam solo.

El 95,7% (181/189) de las cepas presentaron una disminución de la CMI igual o mayor a 3 concentraciones al doble para cefepima-clavulánico con respecto a cefepima sola. En la tabla 16 vemos la concordancia entre el confirmatorio de ambos antibióticos. Cefepima es la que da las CMIs mas bajas y la que se inhibe mejor con clavulánico, ya que el 84% presento una CMI $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$ de cefepima/clavulánico y el 100% con una CMI de $0,25 \mu\text{g/ml}$.

Tabla 16.: Concordancia entre el confirmatorio con aztreonam y cefepima

		CEF vs CEF/clav.		
		≥ 3 diluciones	< 3 diluciones	Total
AZT vs AZT/clav.	≥ 3 diluciones	181	8	189
	< 3 diluciones	0	0	0
	Total	181	8	189

Para confirmar la presencia de BLEE el comparativo menos eficaz fue ceftazidima- ceftazidima /clavulánico.

3. Sensibilidad a los antimicrobianos betalactámicos

La tabla 17 muestra los resultados del n° de cepas con cada valor de CMI y % acumulativos obtenidos frente a los antibióticos betalactámicos estudiados. La tabla 18 muestra CMI₅₀, CMI₉₀ y porcentaje de cepas sensibles, intermedias y resistentes para cada antibiótico betalactámico; así como el rango.

Los porcentajes de resistencia fueron definidos como la suma de las categorías intermedia y resistente.

Tabla 17.: n° de cepas con cada valor de CMI y % acumulativos. -

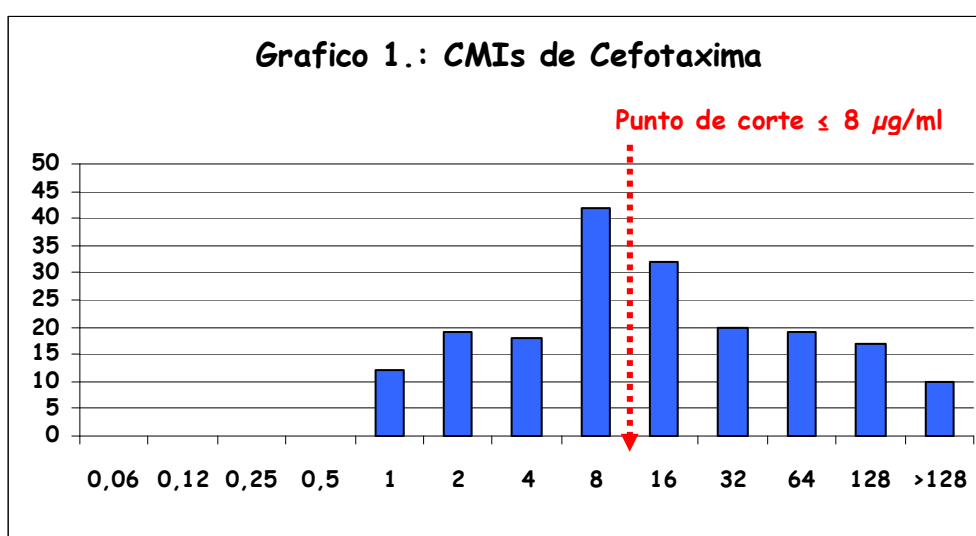
Antibióticos betalactámicos		Valores de CMI												
		0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Amoxi/clav	n° cepas						8	30	73	69	3	2	4	
	% acumul.						4,2%	20,1%	58,7%	95,2%	96,8%	97,8%	100%	
Cefoxitina	n° cepas				2	8	63	66	33	17				
	% acumul.				1,0%	5,2%	38,6%	73,5%	91,0%	100%				
Cefotaxima	n° cepas					12	19	18	42	32	20	19	17	10
	% acumul.					6,3%	16,4%	25,9%	48,1%	65,0%	75,6%	85,7%	94,7%	100%
Ceftazidima	n° cepas					3	27	38	32	3	8	26	31	21
	% acumul.					1,5%	15,8%	35,9%	52,9%	54,4%	58,7%	72,4%	88,8%	100%
Aztreonam	n° cepas			1	1	21	33	24	16	24	31	25	12	1
	% acumul.			0,5%	1,0%	12,1%	29,6%	42,3%	50,7%	63,4%	79,8%	93,1%	99,4%	100%
Cefepima	n° cepas	2	4	9	22	19	29	34	27	23	14	5	1	
	% acumul.	1,0%	3,1%	7,9%	19,5%	29,6%	44,9%	62,9%	77,2%	89,4%	96,8%	99,4%	100%	
Imipenem	n° cepas	2	68	95	18	6								
	% acumul.	1,0%	37,0%	87,3%	96,8%	100%								
Ertapenem	n° cepas	167	16	2	4									
	% acumul.	88,3%	96,8%	97,8%	100%									

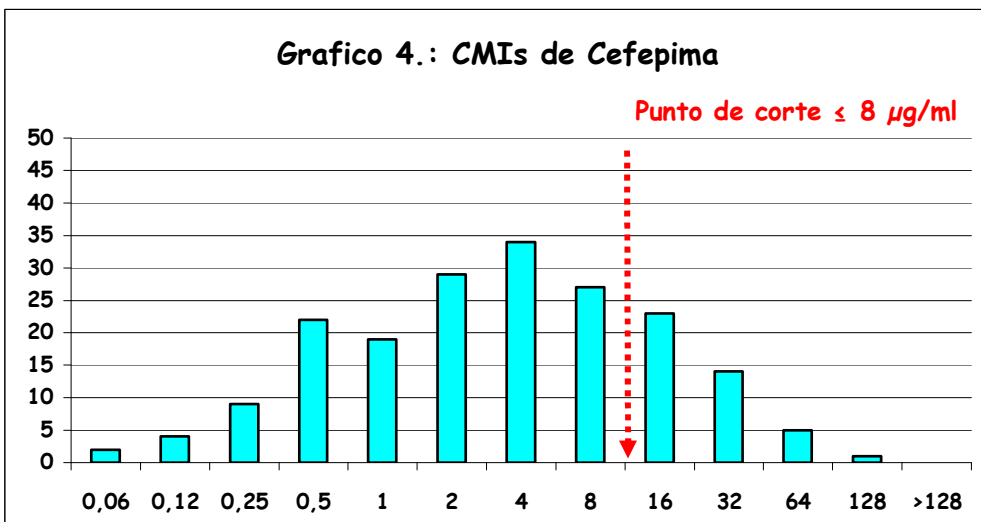
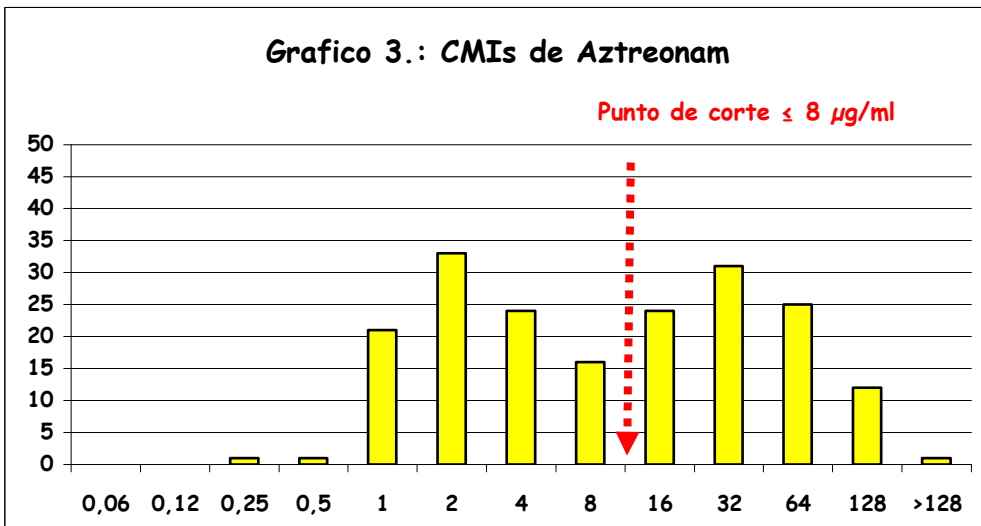
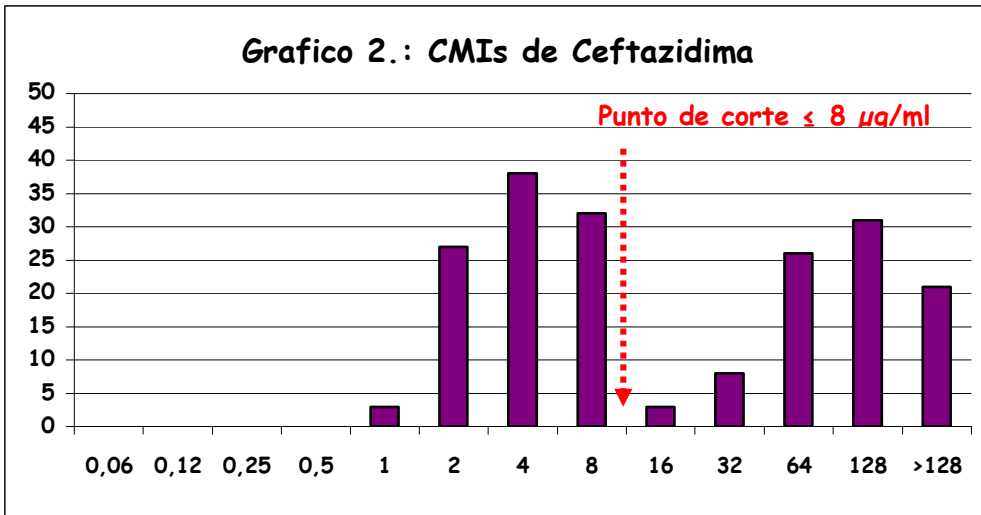
El 36,5 % tuvo una CMI para amoxicilina/clavulánico de 16/8 $\mu\text{g/ml}$, el 4,8 % fue superior y el 58,7 % fue inferior o igual a 8/4 $\mu\text{g/ml}$.

El 85% de las cepas tuvo unas CMIs de cefoxitina que oscilaron entre 2 y 8 $\mu\text{g/ml}$, el 8,9% presento una CMI de 16 $\mu\text{g/ml}$.

La distribución de los valores de CMI para cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima queda reflejada en los gráficos 1, 2, 3 y 4.

El rango de las CMIs para cefotaxima y ceftazidima empieza en un 1 $\mu\text{g/ml}$, si utilizamos como punto de corte para screening de BLEE una CMI ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ tenemos que utilizar simultáneamente estos dos antibióticos. Las doce cepas que presentaron para cefotaxima una CMI de 1 $\mu\text{g/ml}$, presentaron CMIs ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ para ceftazidima y aztreonam. Las tres cepas que presentaron una CMI de un 1 $\mu\text{g/ml}$ para ceftazidima presentaron CMIs ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ para cefotaxima.





Cefotaxima presento una distribución unimodal en torno a 8 $\mu\text{g/ml}$, al igual que cefepima que se distribuyó en torno a 4 $\mu\text{g/ml}$.

Ceftazidima presento una distribución bimodal con dos picos uno en 4 $\mu\text{g/ml}$ y otro en 128 $\mu\text{g/ml}$, al igual que aztreonam que presento un pico en 2 $\mu\text{g/ml}$ y otro en 32 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 18.: CMI50, CMI90 y porcentaje de cepas Sensibles, Intermedias y Resistentes para cada antibiótico, así como el rango.

Antibióticos betalactámicos	CMI50	CMI90	Rango	% S	% I	% R
Amoxicilina/clavulánico	8	16	2-128	58,7	36,5	4,8
Cefoxitina	4	16	1-16	91	9	-
Cefotaxima	8	128	0,06->128	48,1	17,0	34,9
Ceftazidima	8	128	1->128	52,9	1,6	45,5
Aztreonam	8	64	0,06-128	50,7	12,8	36,5
Cefepima	4	32	0,06-128	77,2	12,2	10,6
Imipenem	0,12	0,5	0,06-1	100	-	-
Ertapenem	< 0,03	0,25	0,06-0,5	100	-	-

El 36,5 % de las cepas resulto intermedia para amoxicilina/clavulánico, el 4,8 % fue resistente y el 58,7 % fue sensible con una CMI inferior o igual a 8/4 $\mu\text{g/ml}$.

No hubo ninguna cepa resistente a cefoxitina, obteniéndose un 9% de cepas intermedias.

Todas las cepas fueron sensibles a carbapenemes (imipenem, ertapenem).

Como vemos en la tabla 17 algunos aislados productores de BLEE aparecen como sensibles a las cefalosporinas de tercera generación si utilizamos los puntos de corte convencionales. Si tomamos los puntos de corte del CLSI la sensibilidad a

cefalosporinas viene indicada por una CMI $\leq 8 \mu\text{g/ml}$. De manera que nuestras cepas productoras de BLEE fueron sensibles en un 48% (91/189) a cefotaxima, un 52,9% (100/189) a ceftazidima, un 50,7% (96/189) a aztreonam y un 77,2% (146/189) a cefepima.

Simultáneamente a cefotaxima y ceftazidima lo fueron en un 32% (60/189). Cuatro cepas dieron una CMI $> 8 \mu\text{g/ml}$ para aztreonam siendo sensibles a cefotaxima y ceftazidima. Cefepima no aportó la detección de más cepas resistentes. Un 29,6% (56/189) de las cepas estudiadas presentan CMIs $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ para cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima. Por lo tanto se informarían como sensibles si no se hubiera realizado una prueba de screening para BLEE y sin embargo las cepas producen una enzima con capacidad para hidrolizar estos antibióticos betalactámicos.

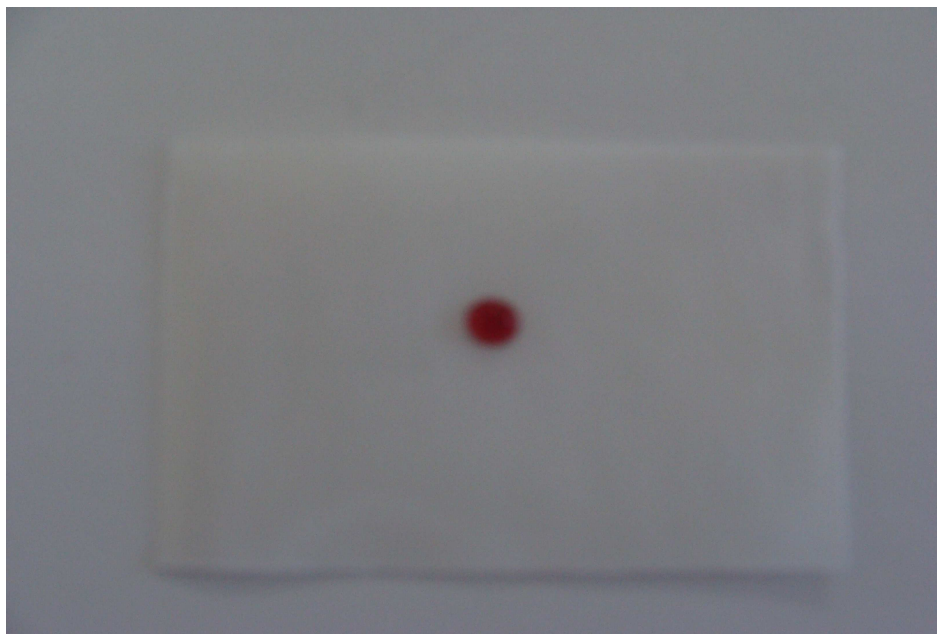
Encontramos cuatro fenotipos de resistencia al relacionar los resultados obtenidos con cefotaxima y ceftazidima: (sensible CMIs $\leq 8 \mu\text{g/ml}$)

- Un 21% (40/189) de las cepas presentaron un patrón de cefotaxima resistente y ceftazidima sensible.
- En un 16% (31/189) de las cepas la ceftazidima fue resistente y la cefotaxima sensible.
- Un 31% (58/189) de las cepas aisladas son resistentes a los dos antibióticos.
- Un 32% (60/189) de las cepas aisladas son sensibles a los dos antibióticos como ya comentamos.

4. Punto isoeléctrico

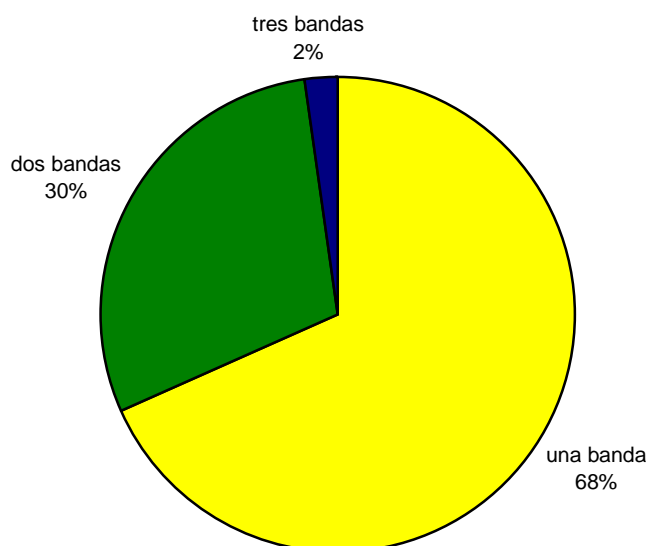
La figura 10 muestra la confirmación de la presencia de una betalactamasa en el extracto crudo enzimático de la cepa estudiada por la aparición de una coloración rojiza al añadir nitrocefín.

Figura 10.: Prueba nitrocefín



El número de bandas detectadas por isoelectroenfoque fueron las siguientes: un 68% (129/189) de las cepas estudiadas presento una banda, un 30% (56/189) dos bandas y un 2% (4/189) tres bandas lo cual podemos ver en el grafico 5.

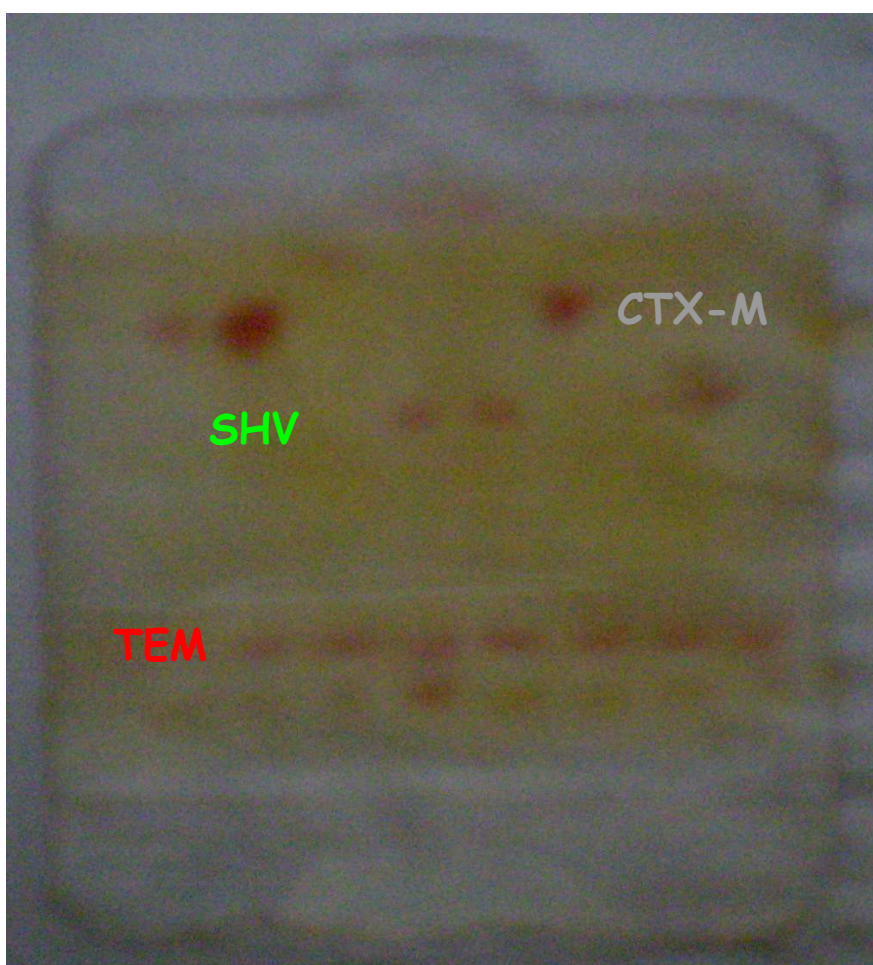
Grafico 5.: nº de bandas detectadas por isoelectroenfoque



Todos los extractos enzimáticos presentaron bandas detectables en el isoelectroenfoque excepto uno cepa 126 (CTX-M no grupo 9) lo que puede ser debido a que su actividad enzimática es inferior al límite de detección del método empleado en el revelado.

En la figura 11 podemos ver la imagen de un isoelectroenfoque con bandas compatibles con TEM, SHV y CTX-M.

Figura 11.: Isoelectroenfoque



Los resultados de la IEF podemos verlos en las tablas 19 y 20.

Tabla 19.: Sensibilidades a antibióticos betalactámicos e IEF de las BLEE

Punto isoelectrico	n° aislamientos	CMI ($\mu\text{g/ml}$) de:							Tipo de betalactamasa
		Amox/clav	Cefoxitina	Cefotaxima	Ceftazidima	Aztreonam	Cefepima	Imipenem	
7,6/8,4	3	8-16	4-8	64-128	32-128	8-32	4-16	0,12-0,25	3 SHV/CTX-M
7,6/8,0	1	8	8	8	4	4	1	0,25	SHV/CTX-M
7,5/8,0	1	4	2	32	32	16	4	0,5	SHV/CTX-M
7,0/8,0	1	8	4	32	64	16	8	0,25	SHV/CTX-M-9
6,5/7,0	1	8	16	129	129	128	64	0,12	TEM/CTX-M
6,3/8,0	2	8-16	4-8	1-8	4-8	2-4	1-4	0,12	TEM/CTX-M-9 TEM/CTX-M
5,3/8,0	9	2-16	2-16	2-128	2-129	2-64	0,25-32	0,12-0,25	7 TEM/CTX-M-9 2TEM/CTX-M
5,3/7,8	2	8	2	1	64	32	0,5	0,5	TEM/SHV y TEM/CTX-M
5,3/6,9	2	16-128	4-8	32-129	129	8-64	8-32	0,12-0,5	2 TEM/CTX-M
8,8	1	16	4	128	128	64	16	0,25	CTX-M
8,4	4	4	8	32	64	32	16	0,12	CTX-M-9
8,3	1	16	4	129	129	128	64	0,25	CTX-M
8,2	15	2-16	1-16	1-64	2-129	1-129	0,12-16	0,12-0,25	4 SHV 1 CTX-M-9 1 CTX-M 5 ND
8,1	5	2-16	1-16	1-129	4-129	2-128	0,12-32	0,06-0,25	4 CTX-M 1 ND
8	46	2-16	1-16	1-128	1-128	1-64	0,12-16	0,12-0,5	33CTX-M-9 11 CTX-M 1SHV/CTX-M-9
7,9	4	8	2	8	4	2	2	0,25	3 CTX-M 1 ND
7,8	18	2-16	2-16	1-32	2-128	1-32	0,25-8	0,12-0,25	23 SHV 5 CTX-M

Tabla 20.: Sensibilidades a antibióticos betalactámicos e IEF de las BLEE

Punto isoelectrico	n° aislamientos	CMI ($\mu\text{g/ml}$) de:							Tipo de betalactamasa
		Amox/clav	Cefoxitina	Cefotaxima	Ceftazidima	Aztreonam	Cefepima	Imipenem	
7,6	6	8-16	2-16	1-32	2-8	1-16	2-8	0,12-0,25	4CTX-M,1SHV,1 no TEM, SHV, CTX-M
7,3	1	16	4	64	128	64	16	0,25	CTX-M
7,2	3	16	2-8	16-128	4-128	4-64	4-16	0,12-0,25	TEM/CTX-M-9 2 CTX-M
7	5	8-16	2-16	8-129	2-129	2-128	2-64	0,12-0,25	1SHV/CTX-M 2 CTX-M 2SHV
6,9	6	4-16	2-8	1-64	2-64	1-32	0,5-16	0,12-0,25	2 CTX-M-9 4 CTX-M
6,8	3	8-32	4-8	32-129	8-129	8-128	8-128	0,12-0,5	2 CTX-M-9 1CTX-M
6,4	1	8	2	16	4	4	4	0,25	TEM
6	3	8-16	1-2	4-8	4-8	2	1-2	0,25	TEM
5,6	1	8	4	8	2	2	2	0,25	TEM
5,4	27	2-128	0,5-16	1-129	1-129	0,5-128	0,06-32	0,12-0,5	25 TEM 1 SHV/CTX-M,1 CTX-M
5,3	18	4-128	2-128	1-129	1-129	0,25-128	0,06-64	0,12-0,5	3 TEM/CTX-M 17 TEM
ND	1	8	16	129	129	128	32	0,12	TEM

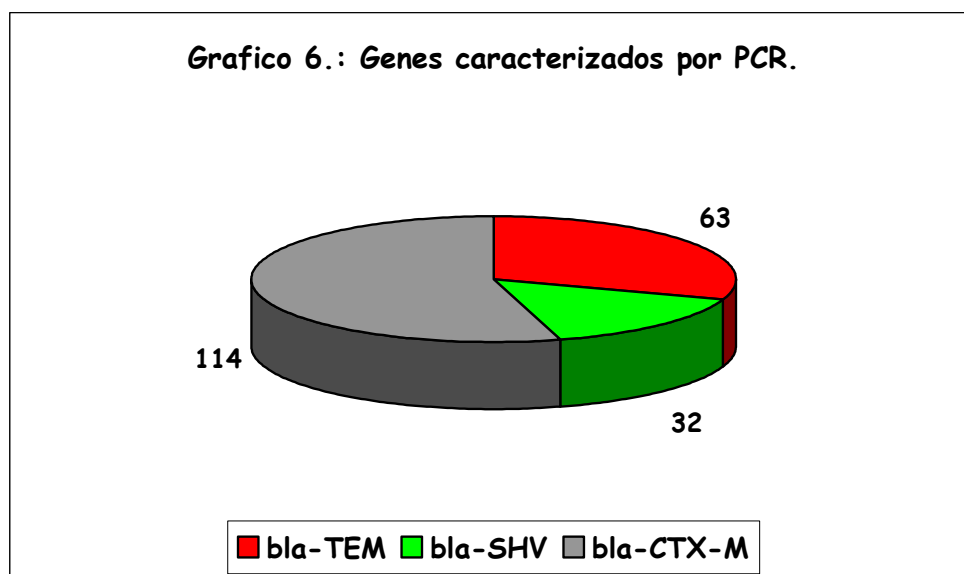
Como vemos en las tablas 19 y 20 el pI mas frecuentemente encontrado fue una banda de 5,4, la combinación mas frecuente dos bandas 5,3/8,0.

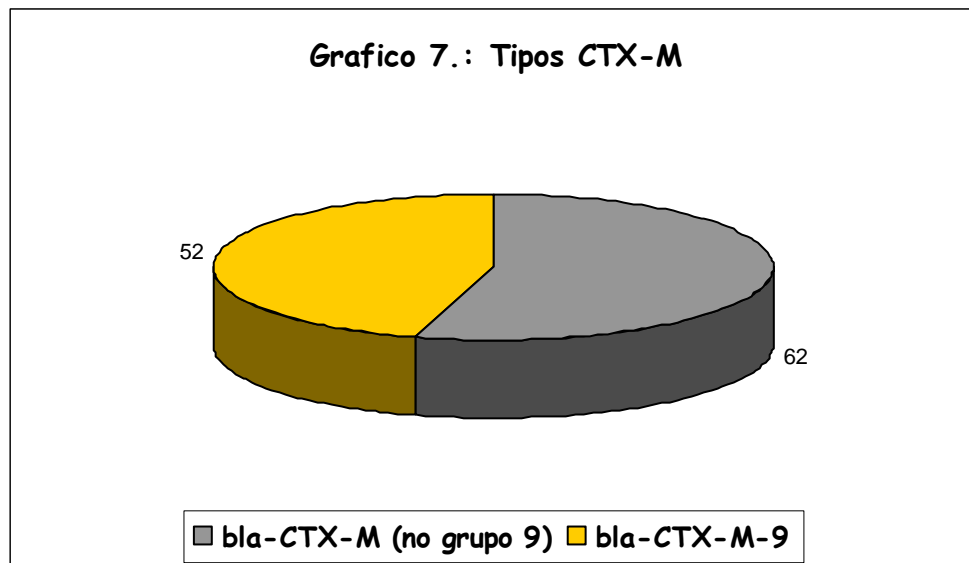
Un problema habitual en la caracterización de las BLEE es que con frecuencia se asocian a betalactamasas de amplio espectro, de manera que cuando se observaron dos o mas bandas en el isoelectroenfoque, las que presentaron un pI de 5,4 se consideraron TEM-1. En nuestro trabajo consideramos que un 27% (51/189) de las cepas productoras de betalactamasas con pI de 5,4 eran TEM-1.

5. Caracterización de las BLEE

Hemos estudiado 189 cepas productoras de BLEE, cuyos genes fueron caracterizados por PCR usando primers específicos para TEM, SHV, CTX-M y CTX-M grupo 9. Un 4% (7/189) de las cepas no amplificaron con ninguno de los tipos de BLEE estudiados.

Los resultados de bla-TEM, bla-SHV y bla-CTX-M los podemos ver en el gráfico 6 (la suma es superior a 182 debido al numero de cepas que producían dos BLEE simultáneamente) y en el grafico 7 vemos las cepas que pertenecen al grupo CTX-M grupo 9 y las de otros grupos.





Los productos obtenidos tras la amplificación se visualizaron mediante electroforesis, utilizando geles de agarosa como vemos en las figuras 11, 12 y 13.

Figura 11.: Observación de los amplificados en los geles de agarosa

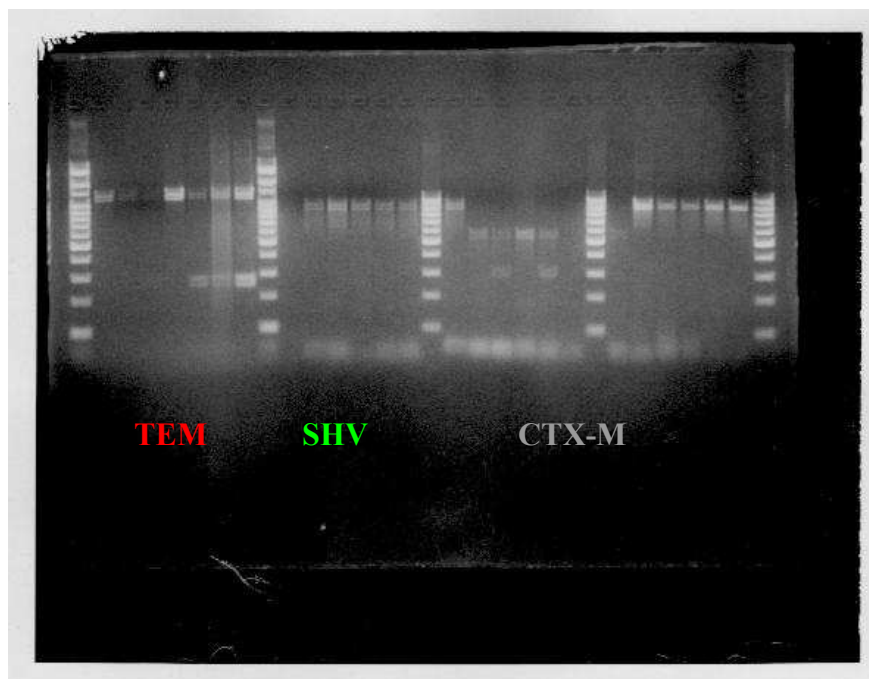


Figura 12.: Observación de los amplificados en los geles de agarosa

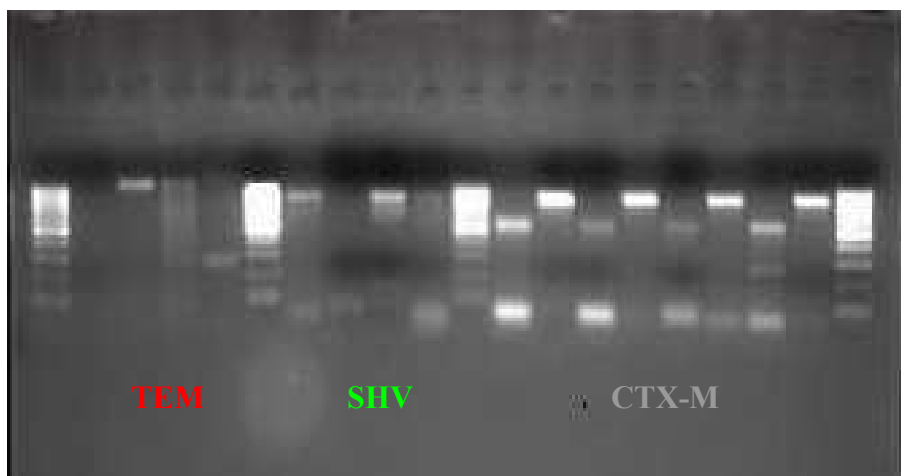
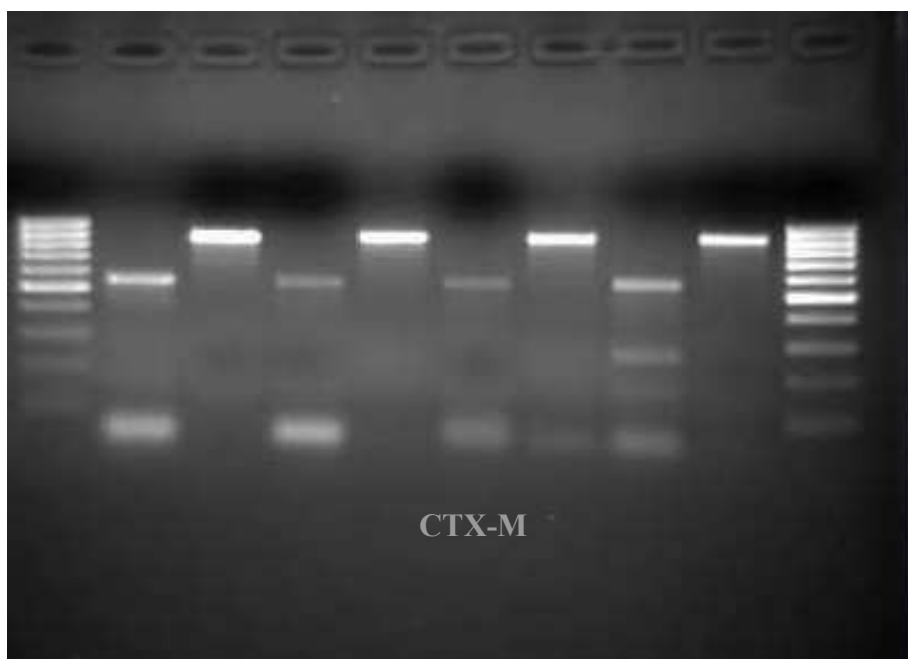


Figura 13.: Observación de los amplificados en los geles de agarosa

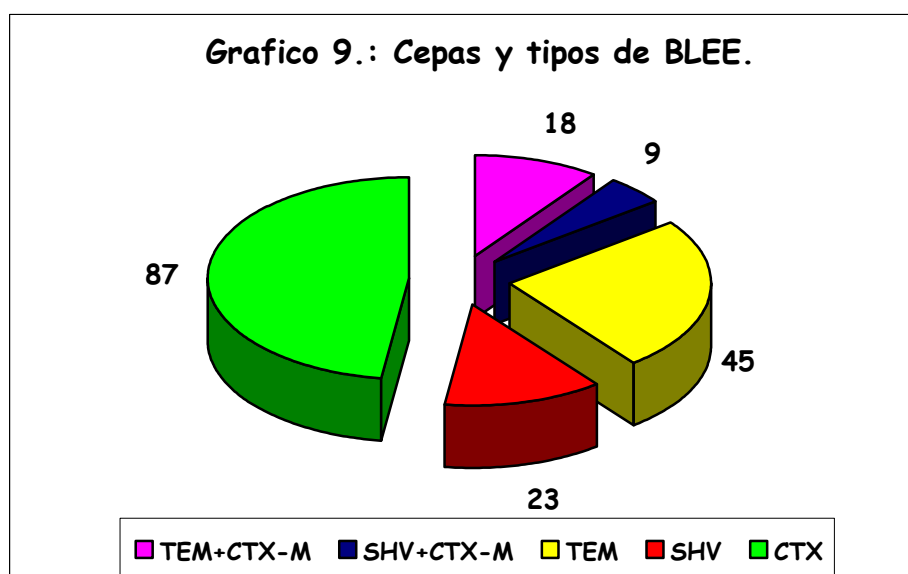


Se detectaron aislados con más de un tipo de BLEE, lo que podemos ver en los gráficos 8 y 9:

Ninguna de las cepas amplificó con los tres tipos de BLEE estudiados TEM+SHV+CTX. Las combinaciones fueron con TEM-1 en 5 casos.

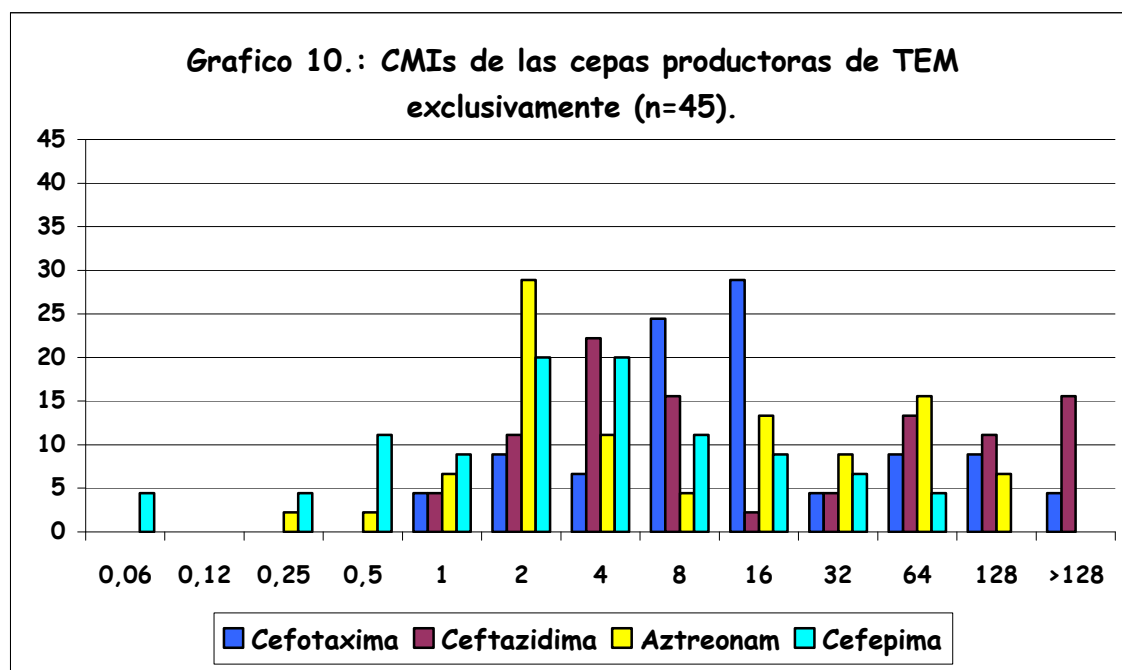
Un 15% (27/182) presento dos tipos de BLEE: el 10% (18/182) los tipos **TEM+CTX-M** y el 5% (9/182) los tipos **SHV+CTX-M**, siendo la combinación mas frecuentemente encontrada **TEM + CTX-M**.

El 85% (155/182) amplificó con un solo tipo de BLEE. El 25% (45/182) el tipo **TEM**, el 13% (23/182) el tipo **SHV** y el 48% (87/182) el tipo **CTX-M** exclusivamente. El tipo de BLEE más prevalente fue **CTX-M**.

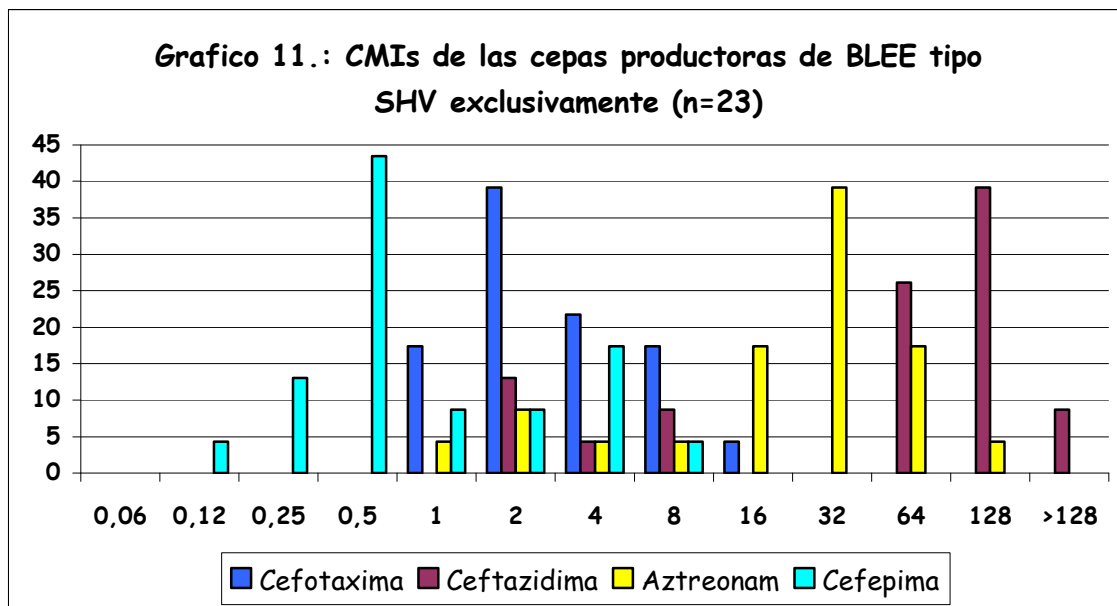


5.1. Distribución de las CMI's obtenidas para cada tipo de BLEE

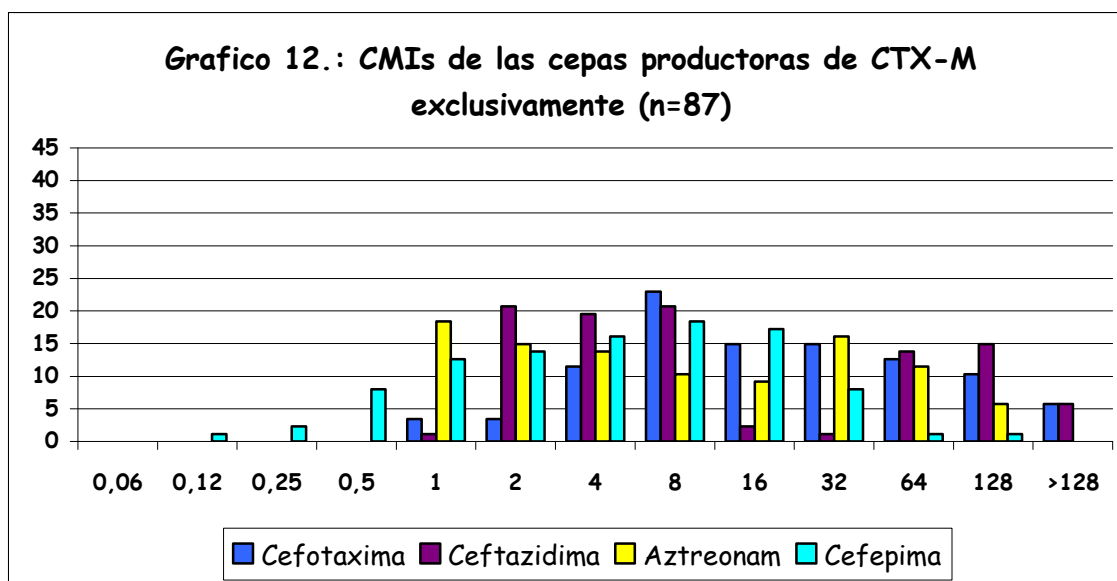
Hemos estudiado las CMI's de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima en relación con los distintos tipos de BLEE determinados, de forma exclusiva en primer lugar (gráficos 10, 11, 12, 13 y 14).



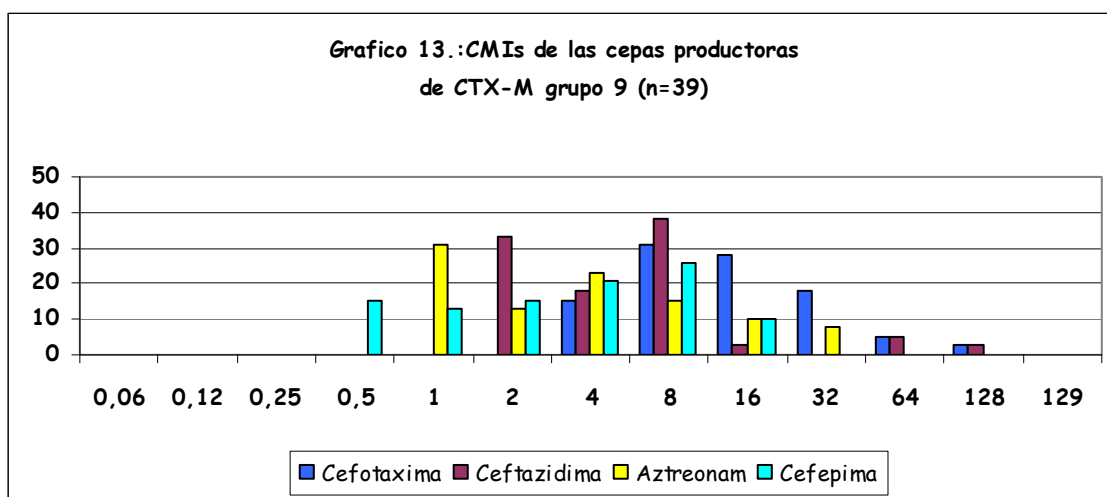
Las cepas productoras de BLEE tipo TEM presentaron CMI's ≥ 16 µg/ml en el **56%**, **47%**, **44%** y **20%** para cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima respectivamente, siendo la **cefotaxima** la cefalosporina que presento el porcentaje mas elevado de resistencia esto es debido a que presenta una distribución con un pico en 16 µg/ml (cepas intermedias), sin embargo es ceftazidima la que presenta el mayor número de cepas con CMI's > 64 µg/ml, su distribución es bimodal con un pico en 4 µg/ml y el otro en $>$ de 128 µg/ml. Cefepima es la que presento el menor porcentaje de resistencia.



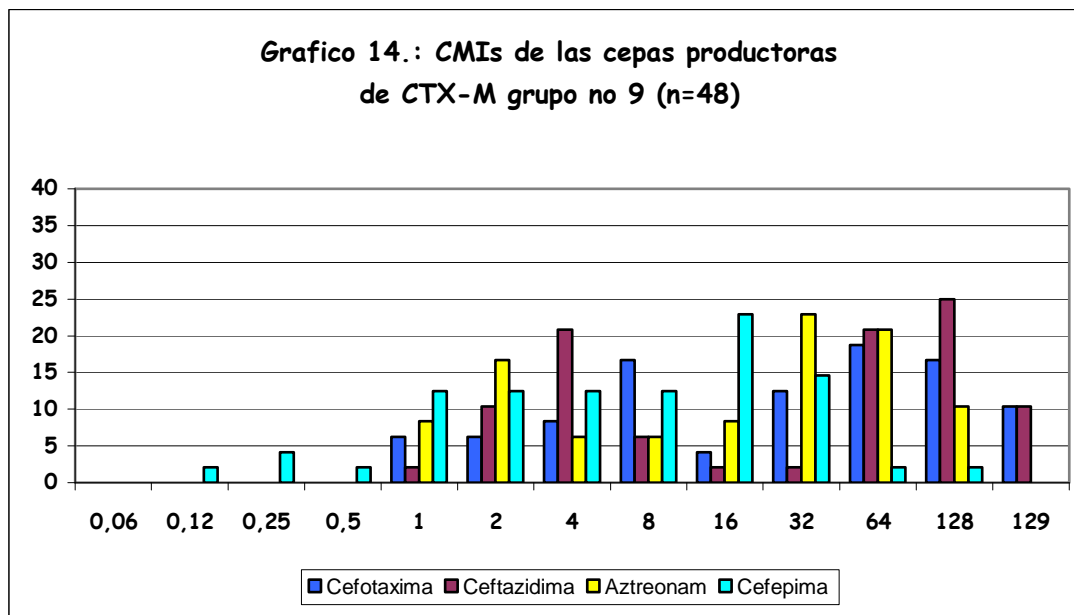
Las cepas productoras de SHV presentaron CMI's ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ en un 5%, 71%, 57% y 0% para cefotaxima, **ceftazidima**, aztreonam y cefepima respectivamente, siendo la **ceftazidima** el betalactámico que presentó el porcentaje de resistencias más elevado seguido de aztreonam y destacamos cefepima con 100% de sensibilidad.



Las cepas productoras de CTX-M presentaron CMI's $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ en un **59%**, **38%**, **42%**, y **28%** frente a **cefotaxima**, ceftazidima, aztreonam y cefepima respectivamente, siendo la **cefotaxima** la que presento el porcentaje de resistencias mas elevado y cefepima el menor.



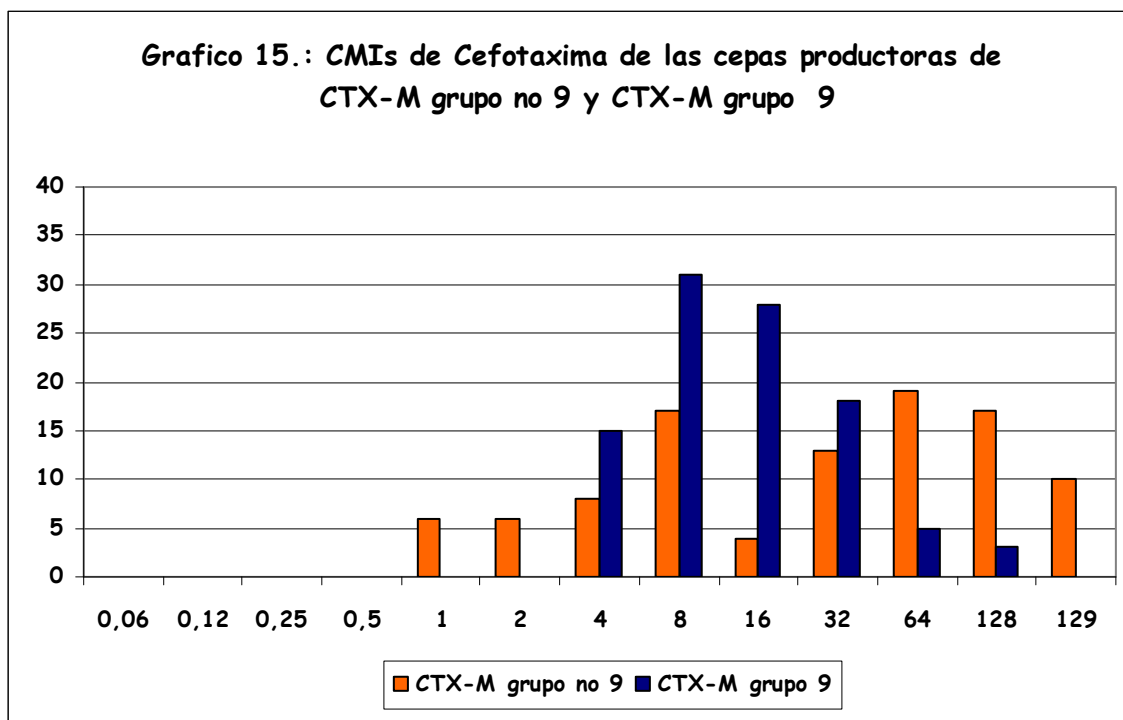
Las cepas productoras de CTX-M grupo 9 presentaron CMI's $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ en un **54%**, **11 %**, **18%** y **10%**, a **cefotaxima**, ceftazidima, aztreonam y cefepima respectivamente siendo la cefotaxima la que presento el porcentaje de resistencias mas elevado.



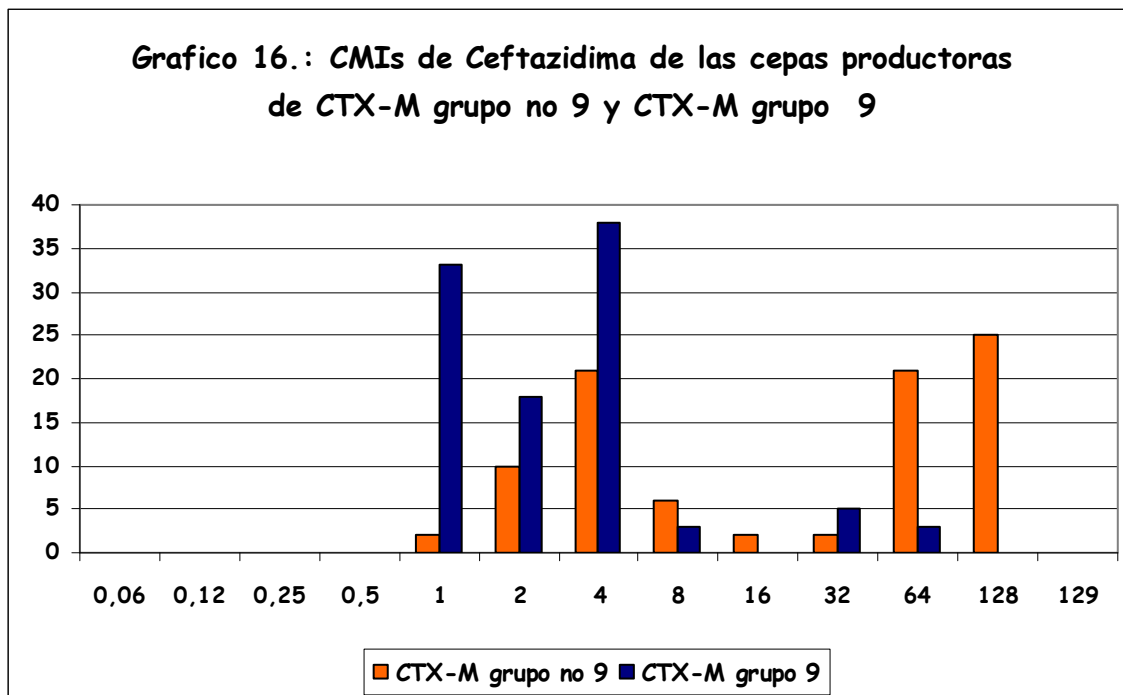
Las cepas productoras de CTX-M grupo no 9 presentaron CMI's ≥ 16 µg/ml en un **63%**, **60 %**, **63%** y **42%**, a **cefotaxima**, **ceftazidima**, **aztreonam** y **cefepima** respectivamente siendo la cefotaxima y aztreonam las que presentaron los porcentajes de resistencias mas elevado.

Los gráficos 15, 16, 17 y 18 muestran las CMI's de las cepas productoras de CTX-M grupo 9 y grupo no 9 de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima.

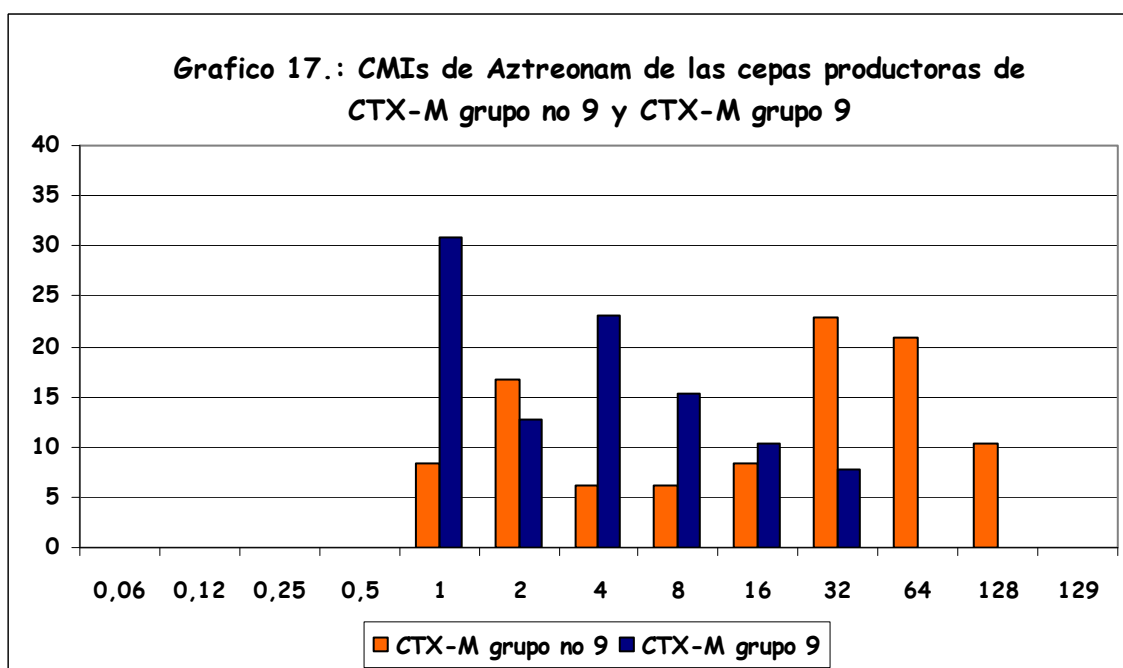
En estas graficas se pone de manifiesto que las cepas que producen CTX-M grupo 9 forman un conjunto homogéneo con una distribución unimodal, mientras que los otros grupos de CTX-M tienen un amplio rango de CMI que indica la variedad de sus perfiles hidrolíticos.



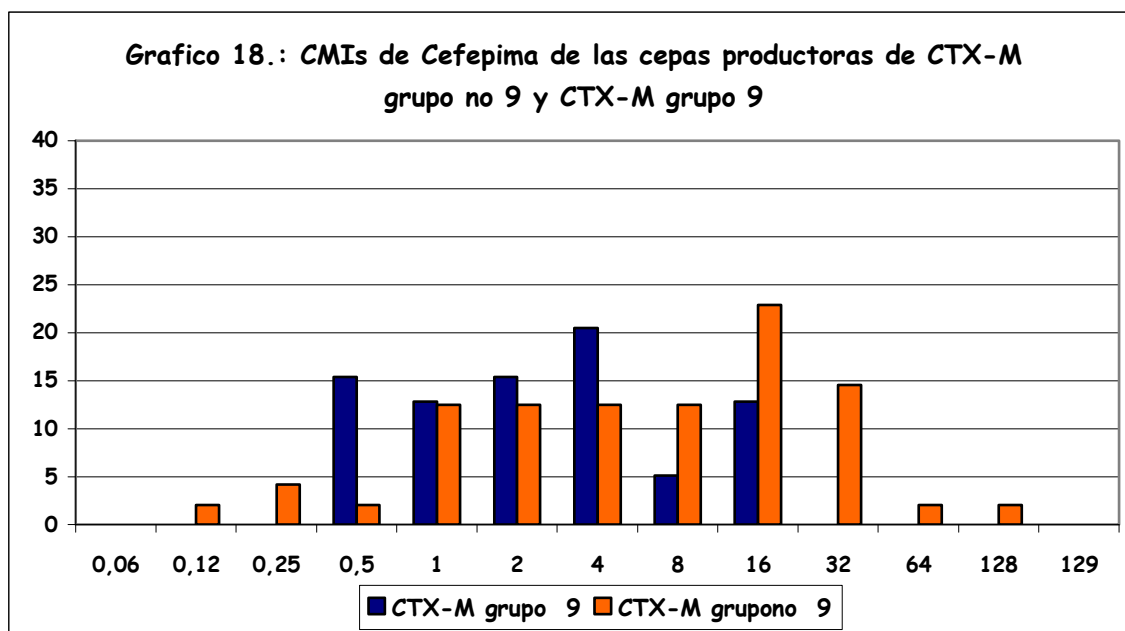
Las productoras de CTX-M grupo 9 se distribuyen en torno a 8 µg/ml, con valores medios de resistencia. Las cepas que producen otros tipos de CTX-M forman un conjunto heterogéneo con un pico en 64 µg/ml de resistencia alta y otro en 8 µg/ml de media, incluso el rango baja hasta 1 µg/ml. Hay diversidad en su hidrólisis de cefotaxima.



Las productoras de CTX-M grupo 9 son, con excepciones, 11%, sensibles a ceftazidima. Las cepas que producen otros tipos de CTX-M forman un conjunto heterogéneo con un pico en 4 µg/ml de sensibilidad y otro en 128 µg/ml de alta resistencia. Hay dos grupos diferentes en su hidrólisis de ceftazidima.



Las productoras de CTX-M grupo 9 son, con excepciones, 18%, sensibles a aztreonam. Las cepas que producen otros tipos de CTX-M forman un conjunto heterogéneo con un pico en 2 µg/ml de sensibilidad y otro en 32 µg/ml de resistencia. Hay dos grupos diferentes en su hidrólisis de aztreonam.

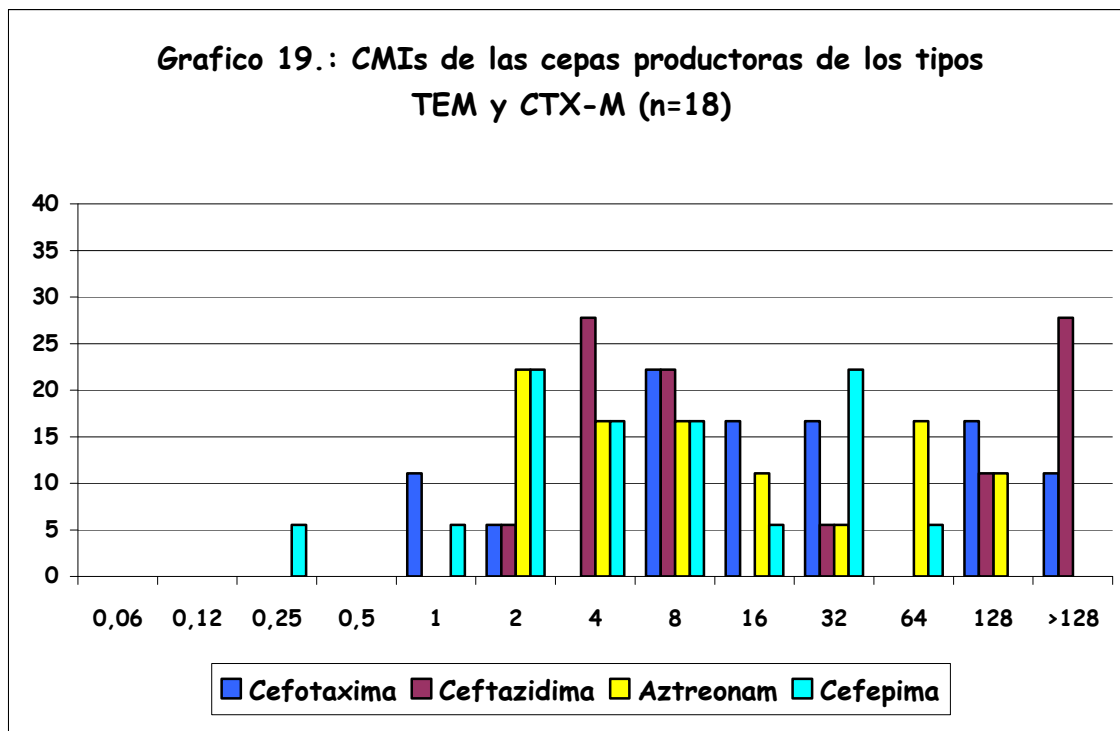


Las cepas productoras de CTX-M grupo no 9 se distribuyen entre un rango muy amplio, son las que presentan los valores más altos de CMI de cefepima.

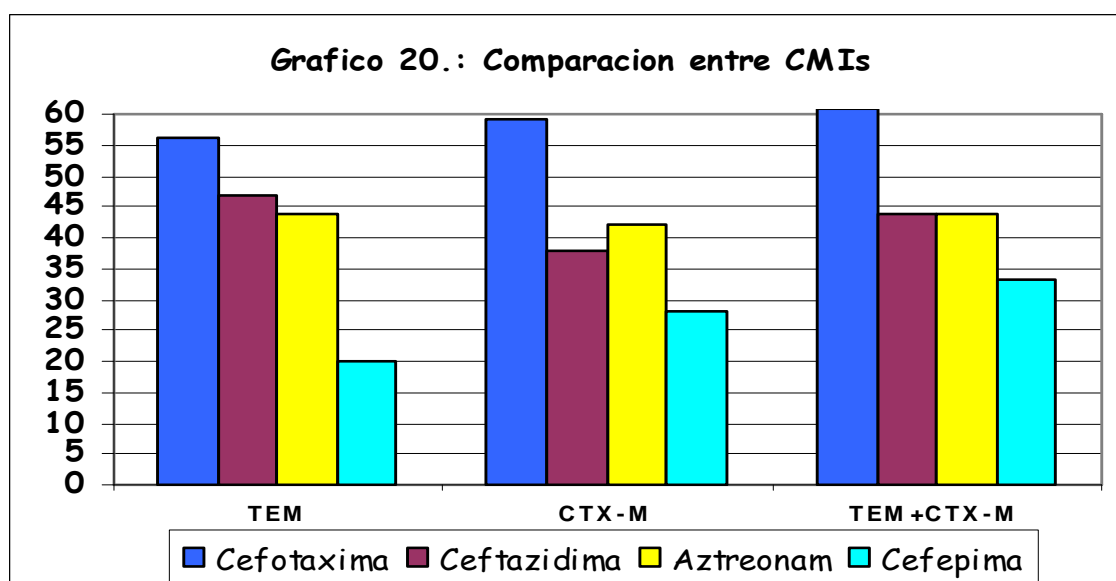
Las cepas productoras de CTX-M grupo no 9 son un conjunto heterogéneo en el que una parte se distribuye en torno a valores de CMI mas altos de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima que las cepas productoras de CTX-M grupo 9.

5.2. Combinaciones de BLEE: Distribución de las CMIs obtenidas

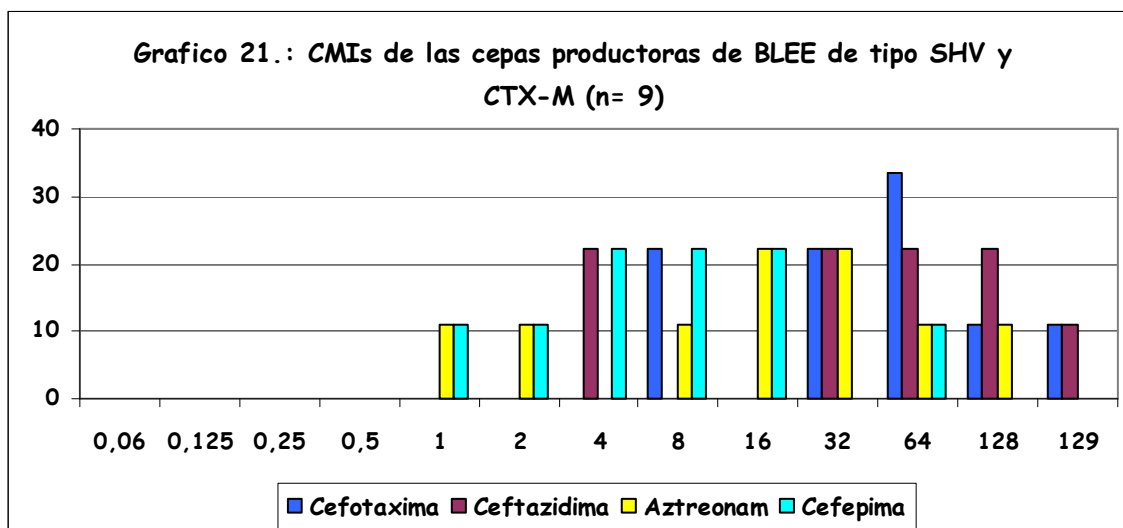
En los gráficos 19 y 21 podemos ver la distribución de las CMIs obtenida de las diferentes combinaciones y en los gráficos 20 y 22 la comparación entre las CMIs con las CMIs obtenidas cuando la cepa es productora de uno solo de estos tipos de BLEE.



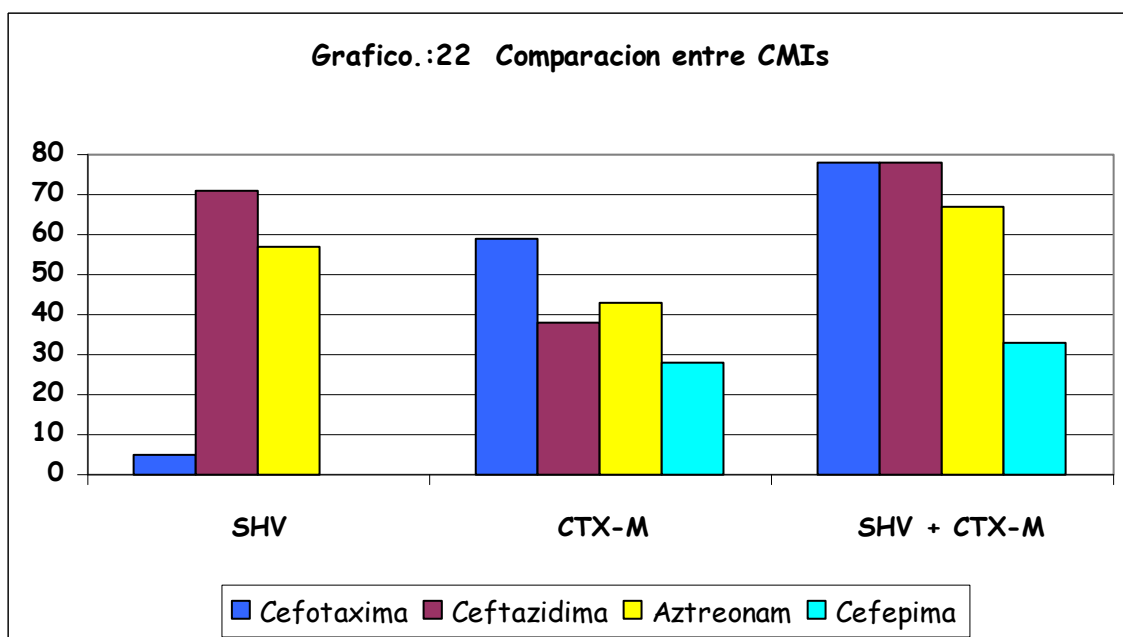
Las cepas productoras de TEM y CTX-M presentaron CMI's ≥ 16 µg/ml en un 61%, 44%, 44% y 33% a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima respectivamente, siendo la **cefotaxima** la que presento el porcentaje de resistencias más elevado y cefepima el menor.



Como vemos en el gráfico 20, al comparar las CMI's obtenidas con esta combinación con las CMI's obtenidas cuando la cepa es productora de uno solo de estos tipos de BLEE, observamos un aumento en el porcentaje de cepas con CMI's ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ en todos los casos y especialmente cefepima.



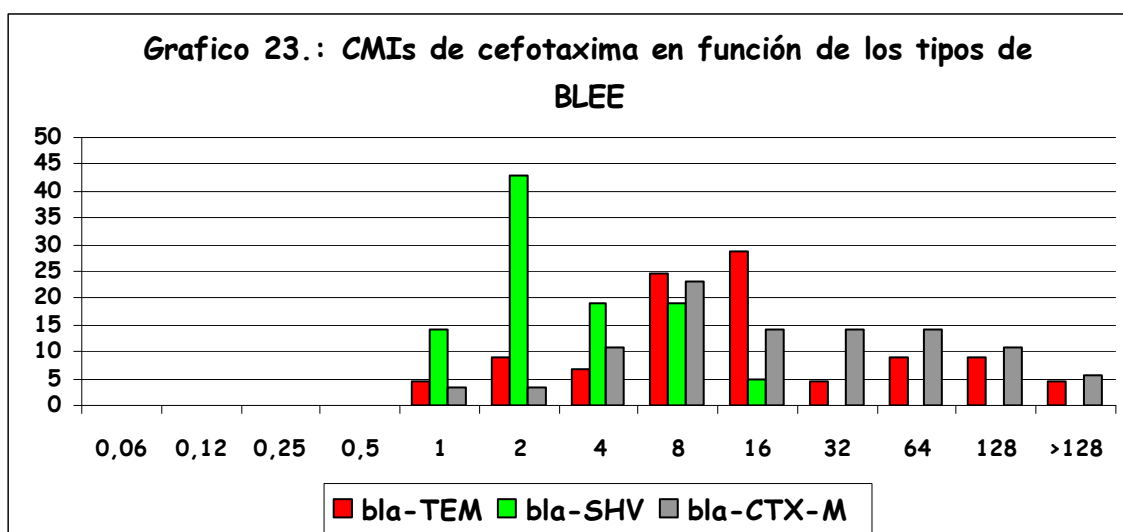
Las cepas productoras de SHV y CTX-M presentaron CMI's ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ en un 75%, 75%, 75% y 25% a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima respectivamente siendo la **cefepima** la que presentó el porcentaje de resistencias menor.



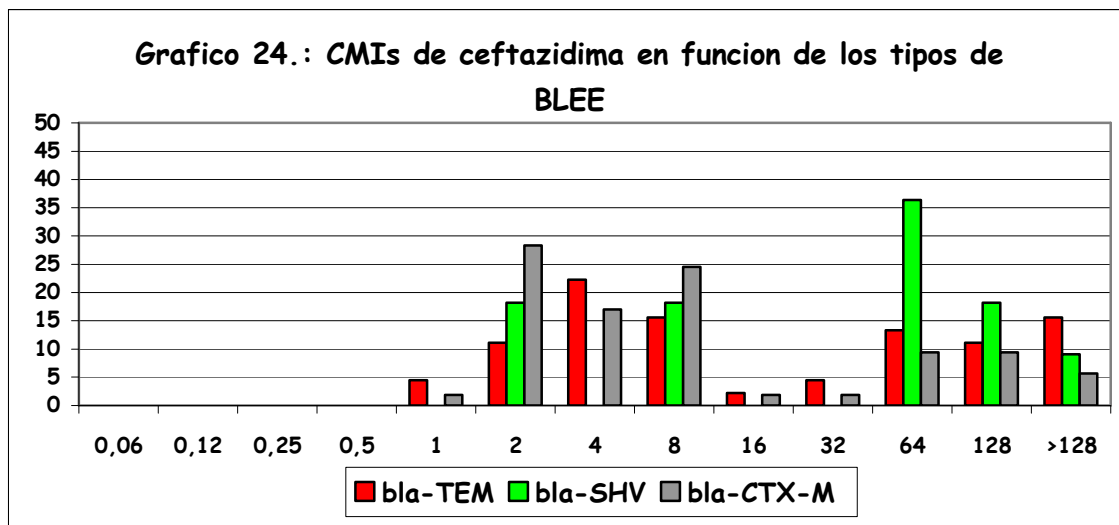
Al comparar las CMI's obtenidas por esta combinación con las CMI's obtenidas cuando la cepa es productora de uno solo de estos tipos de BLEE, observamos un claro aumento en el porcentaje de cepas con CMI's ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ en todos los casos

5.3. Distribución de las CMI's de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima indicando el tipo de BLEE

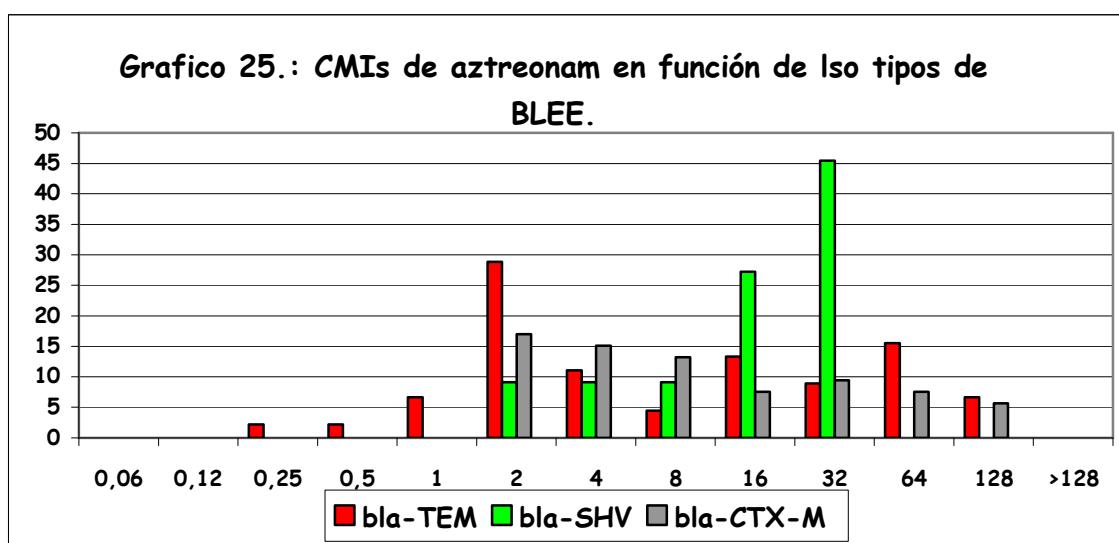
Las CMI's de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima según tipo de BLEE determinados son representadas en los gráficos 23, 24, 25 y 26 respectivamente.



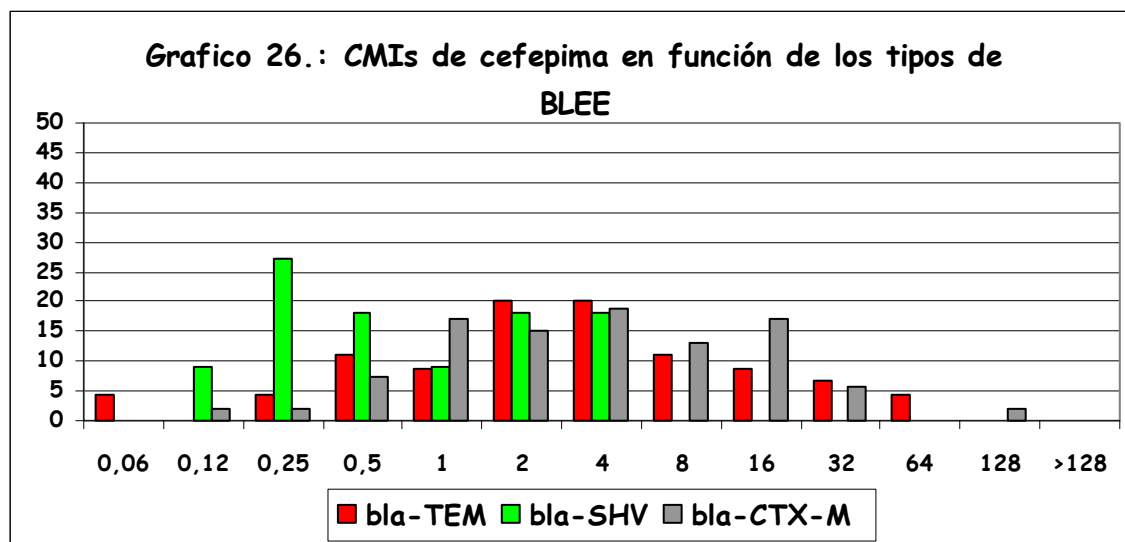
Las CMI's altas a **cefotaxima** corresponden a cepas productoras de TEM y especialmente a CTX-M, mientras que para las BLEE tipo SHV el rango fue de 1 $\mu\text{g/ml}$ a 16 $\mu\text{g/ml}$.



La distribución bimodal de ceftazidima la presentan los tres tipos de BLEE encontrados. El tipo CTX-M tiene con una frecuencia mucho mayor CMI's bajas, entre 1 µg/ml y 16 µg/ml.



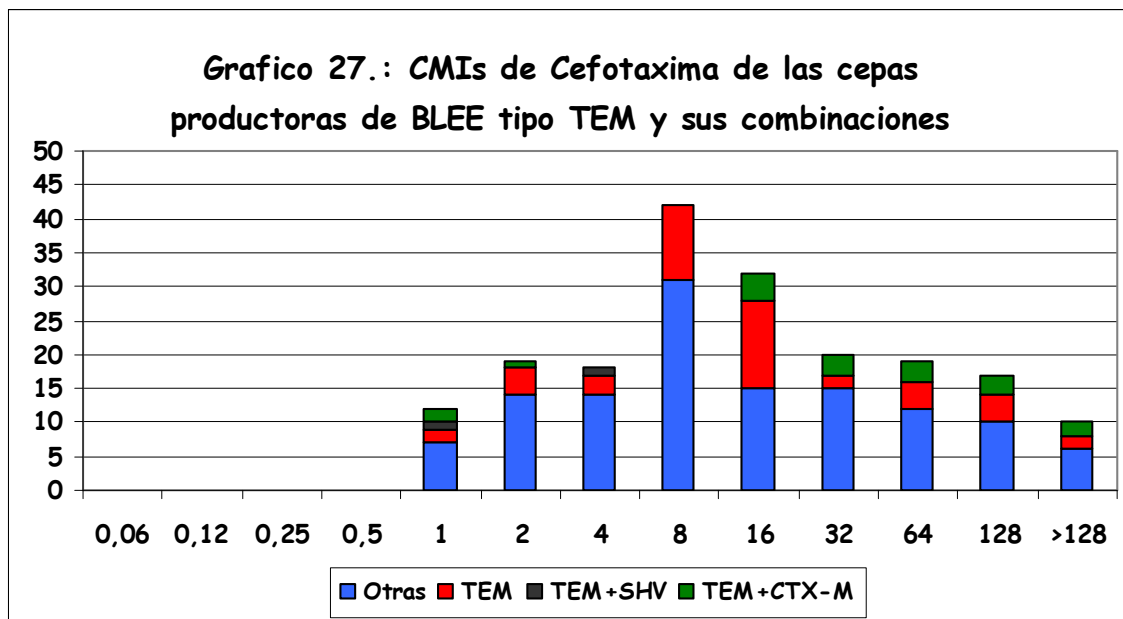
Aunque el porcentaje más alto de cepas con valores de resistencia a aztreonam, 57%, corresponde a las cepas productoras de SHV los valores más altos (64-128 µg/ml) pertenecen a cepas productoras de CTX-M y TEM, destacando el amplio rango de valores obtenido por estas últimas.



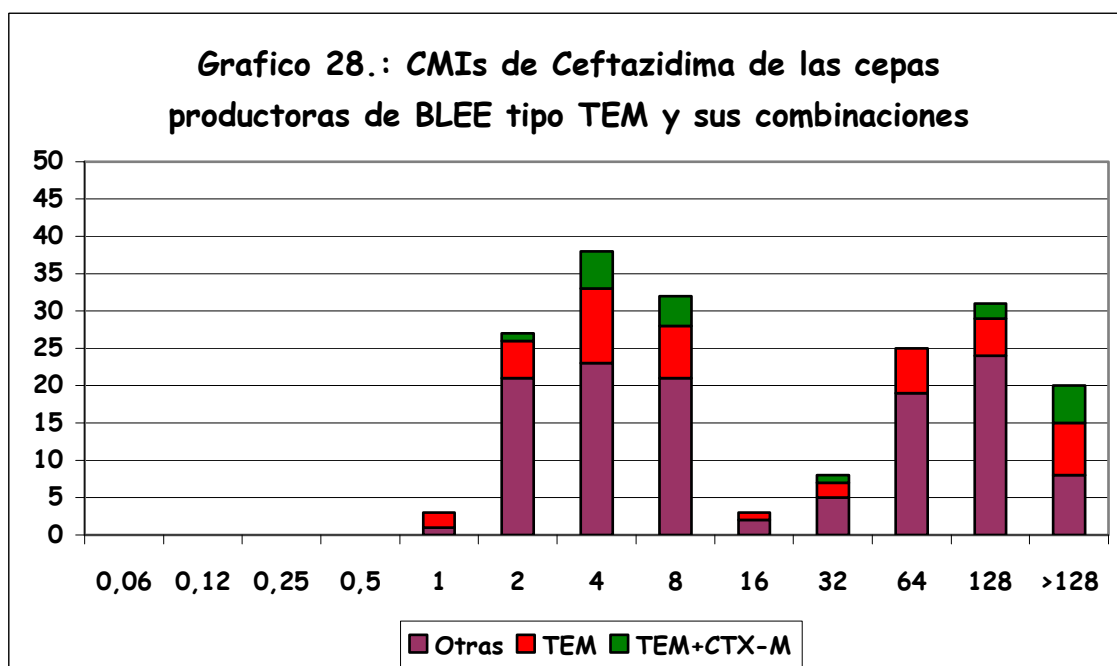
Los valores mas bajos corresponden a cepas productoras de SHV, ninguna fue resistente y los más altos como era de esperar a cepas de CTX-M.

5.4. Distribución de las CMI's de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima en las cepas productoras de BLEE tipo TEM, SHV y CTX-M y sus combinaciones dentro del conjunto total de valores de CMI

En los gráficos 27, 28, 29 y 30 vemos la distribución de las CMI's de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima en las cepas productoras de **BLEE tipo TEM** y sus combinaciones dentro del conjunto total de valores de CMI

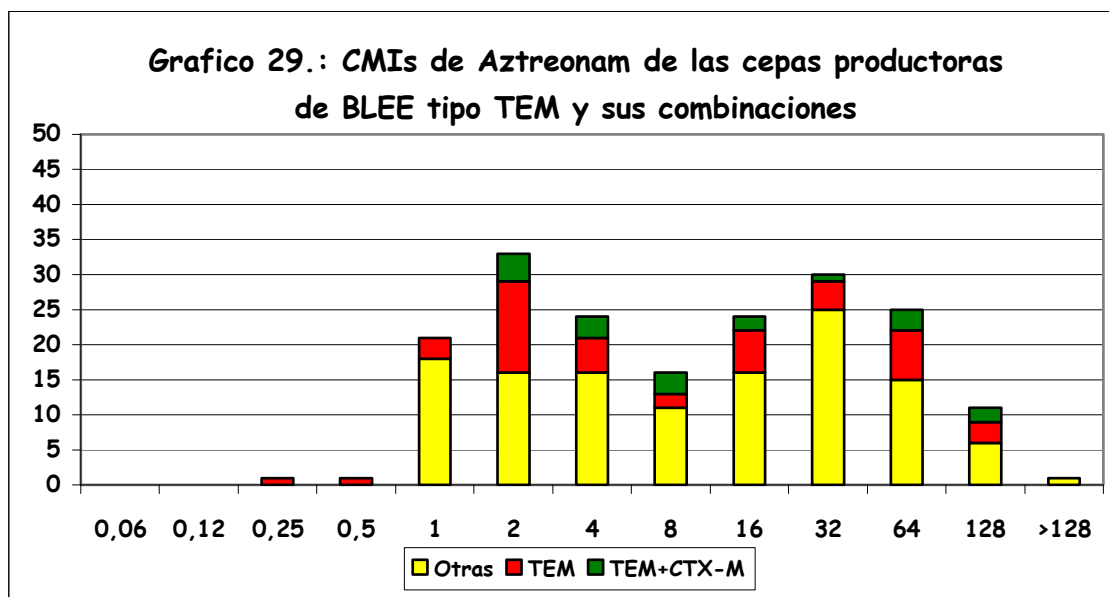


Las cepas productoras de BLEE tipo TEM tienen un amplio rango de valores de CMI de cefotaxima, aumentan cuando se asocia con CTX-M.

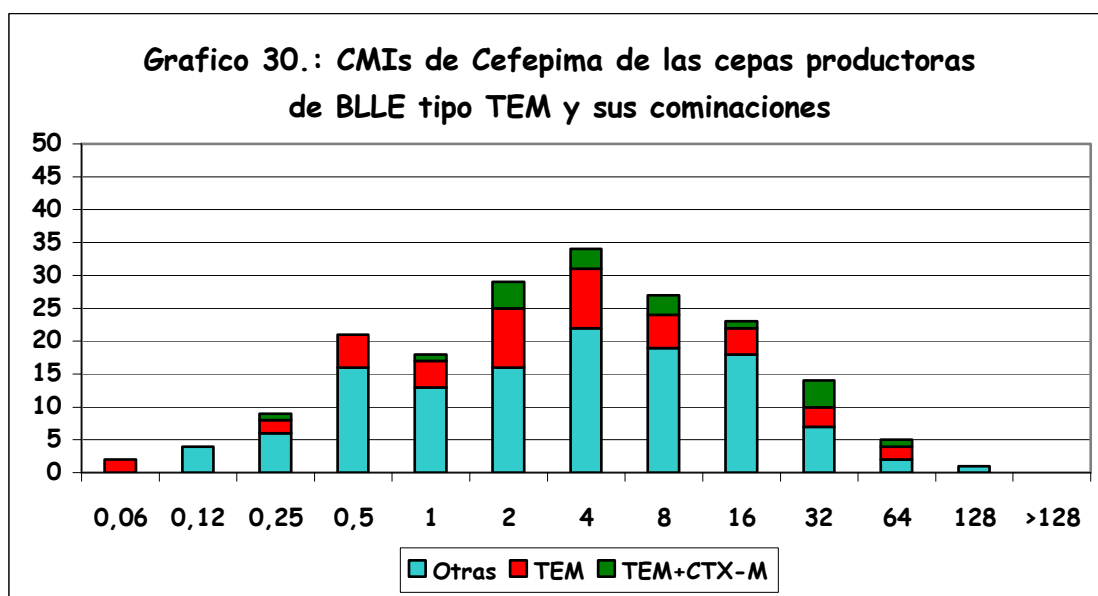


Las cepas productoras de BLEE tipo TEM tienen una distribución bimodal, hay diferencias notables en el nivel de resistencia a ceftazidima, un grupo presenta CMI muy altas, con la moda en 128 µg/ml, no se afecta

cuando se asocia con CTX-M.

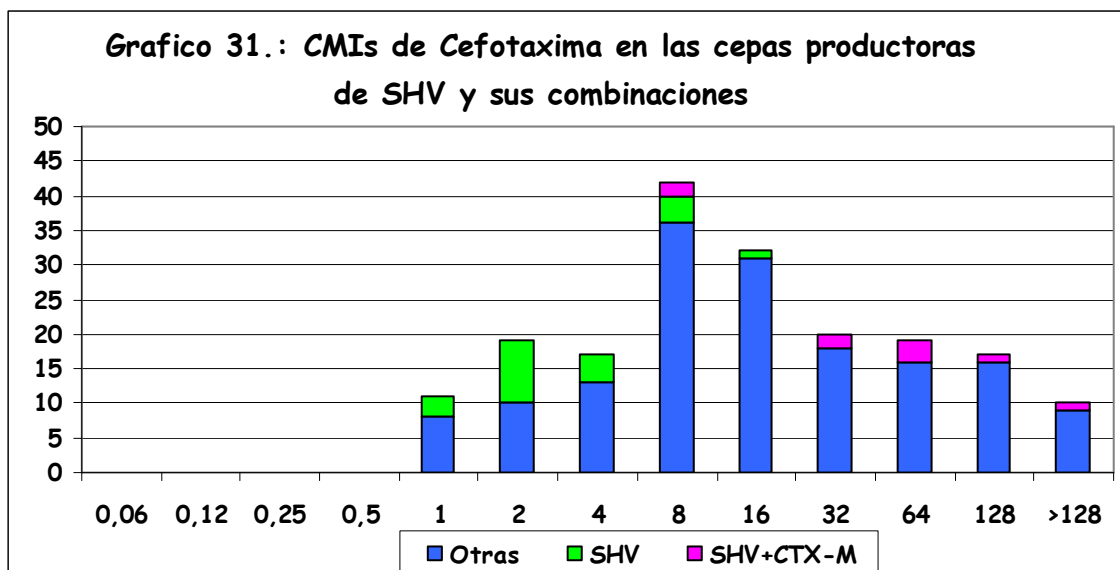


Las cepas productoras de BLEE tipo TEM tienen también una distribución bimodal, hay diferencias notables en el nivel de resistencia a aztreonam, un grupo presenta CMI altas, con la moda en 32 µg/ml, no se afecta cuando se asocia con CTX-M.

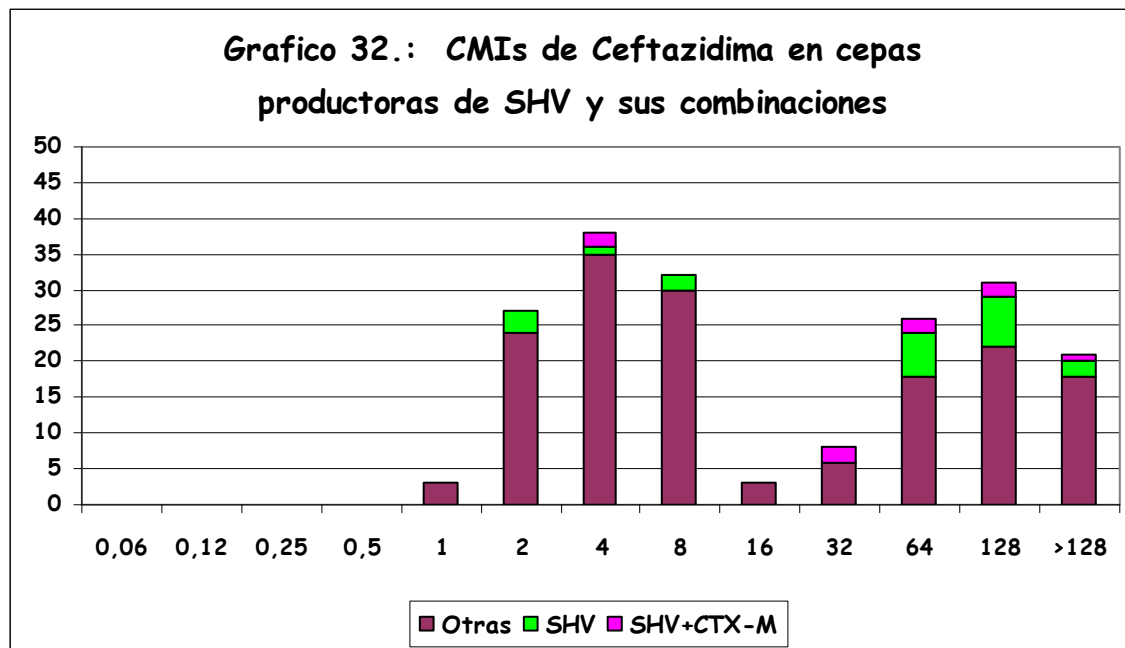


Las cepas productoras de BLEE tipo **TEM** tienen un amplio rango de valores de CMI de cefepima, aumentan cuando se asocia con CTX-M.

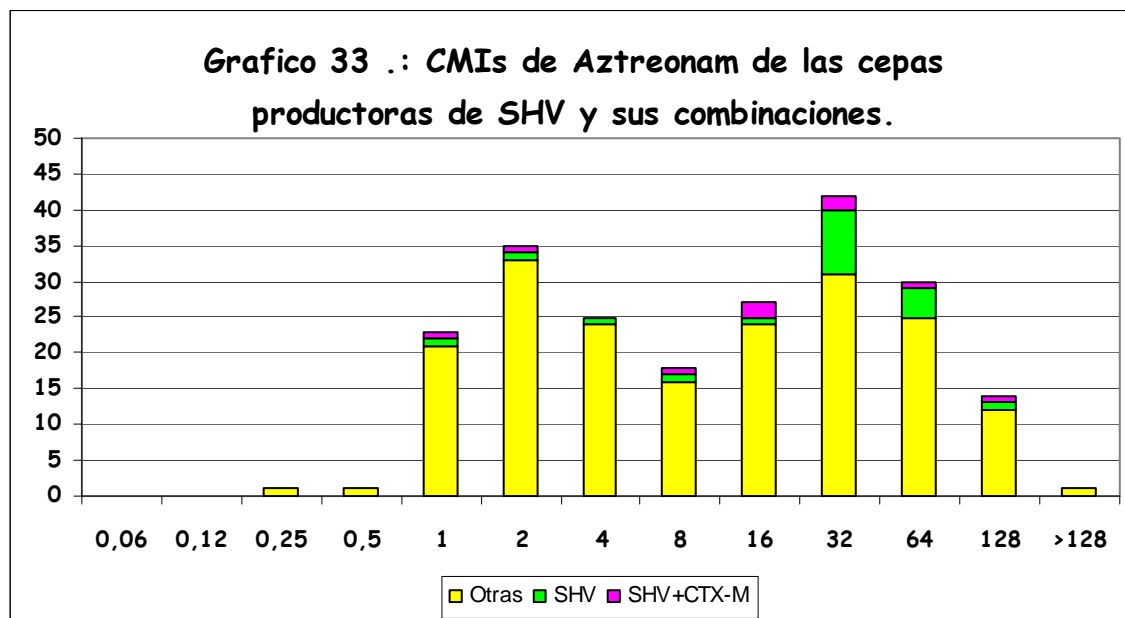
En los gráficos 31, 32, 33 y 34 vemos la distribución de las CMIs de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima en las cepas productoras de BLEE tipo **SHV** y sus combinaciones dentro del conjunto total de valores de CMI



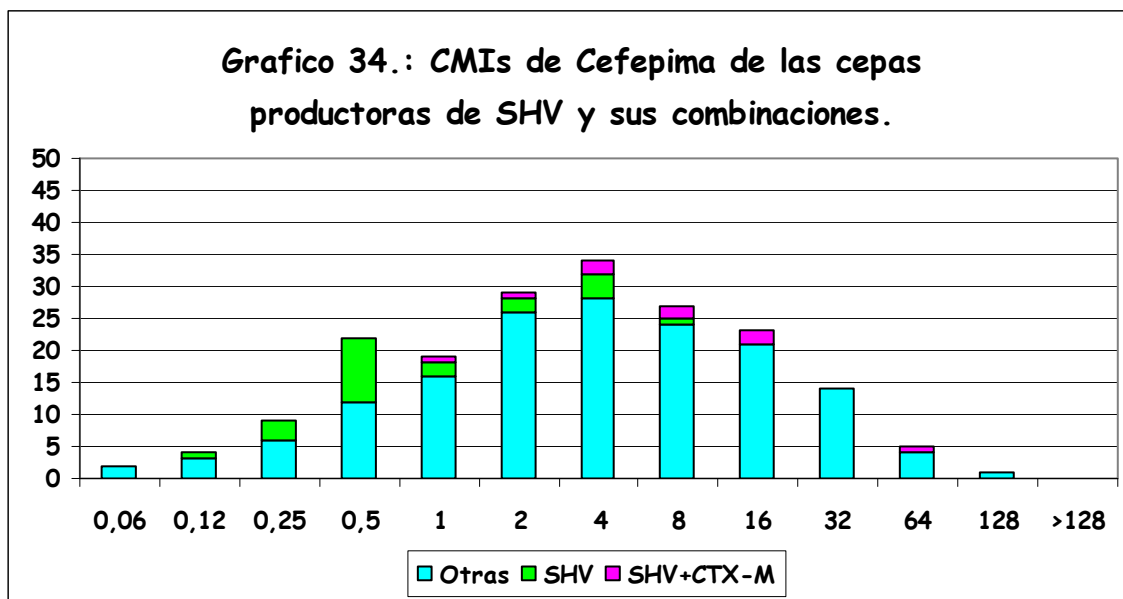
Los aislados que producen **SHV** tienen unas CMI de cefotaxima bajas, cuando se combinan con CTX-M suben sus valores hasta 128 $\mu\text{g/ml}$.



Los aislados que producen **SHV** tienen unas CMI de ceftazidima altas, es indiferente que se combinen con CTX-M.

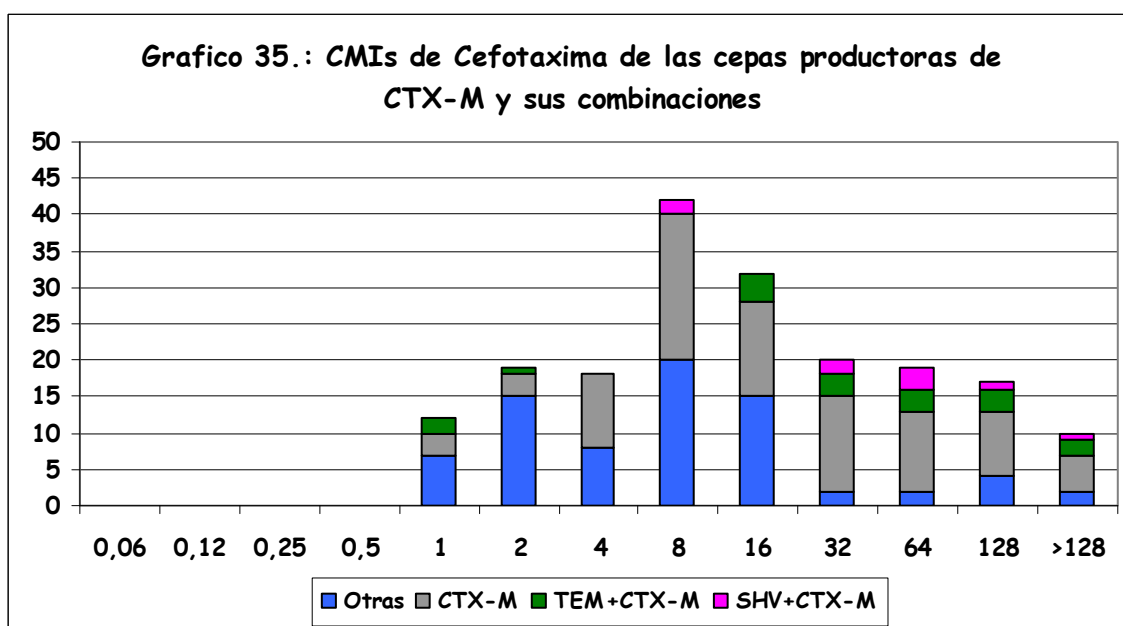


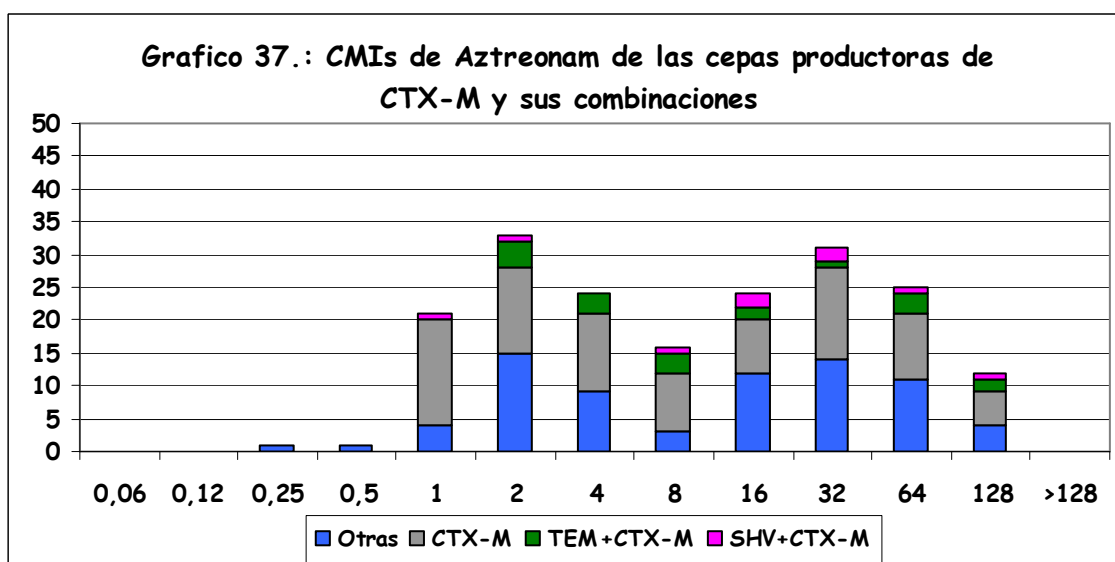
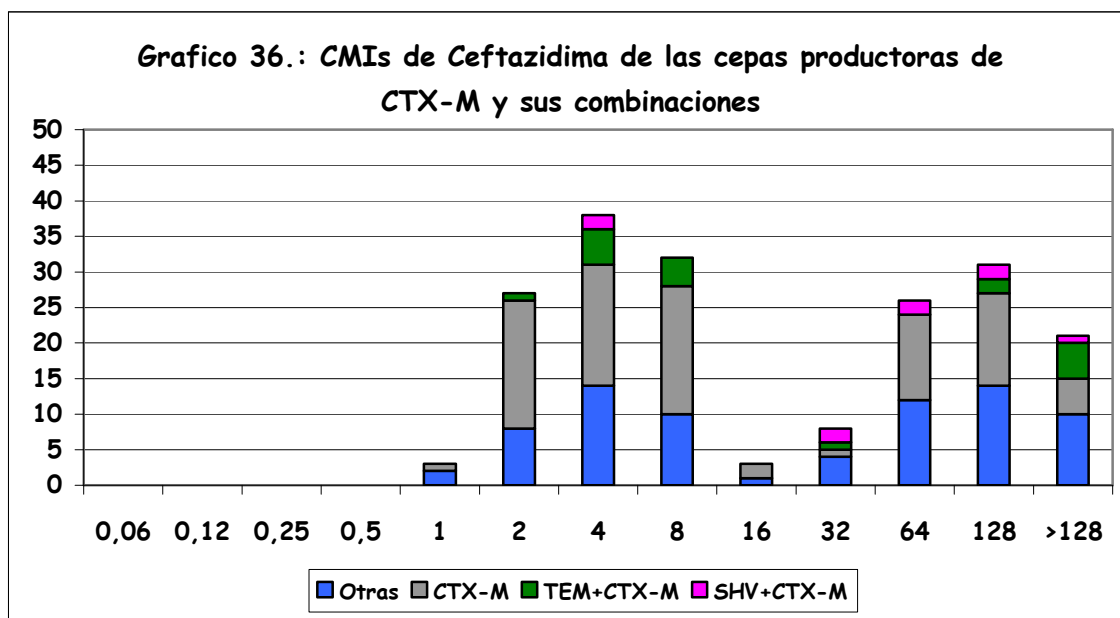
Los aislados que producen **SHV** tienen unas CMI de aztreonam altas, es indiferente que se combinen con CTX-M.

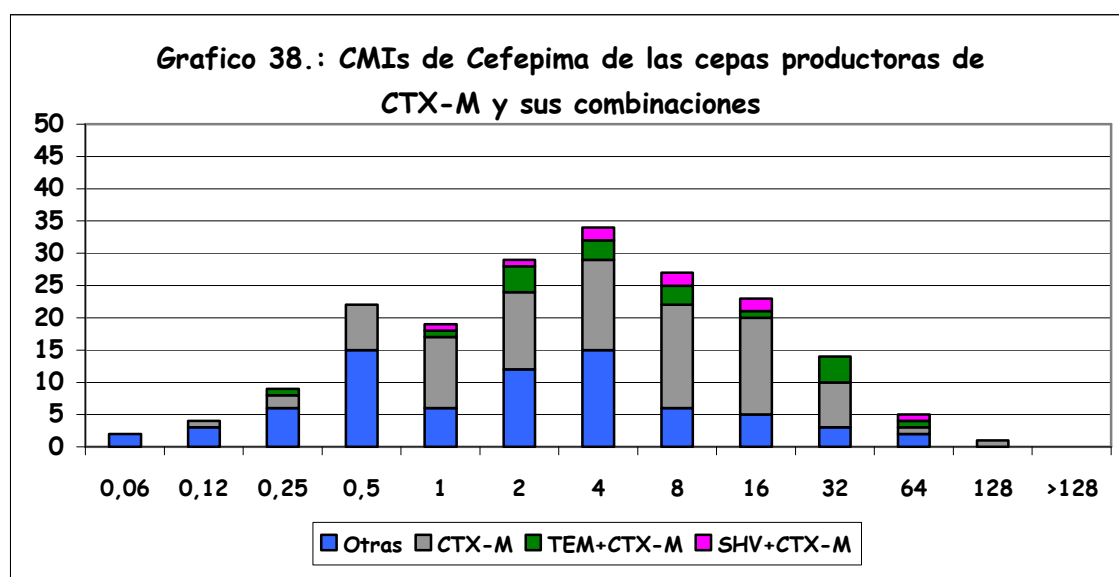


Los aislados que producen **SHV** tienen unas CMI de cefepima bajas, cuando se combinan con **CTX-M** suben sus valores hasta 64 $\mu\text{g/ml}$.

En los gráficos 35, 36, 37 y 38 vemos la distribución de las CMI de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima en las cepas productoras de **BLEE** tipo **CTX-M** y sus combinaciones dentro del conjunto total de valores de CMI







Amplia distribución de valores de las CMIs de los cuatro antibióticos lo cual indica la heterogeneidad de este grupo

6. Resistencias asociadas

6.1. Sensibilidad a los antimicrobianos no betalactámicos

La tabla 21 muestra los resultados del nº de cepas con cada valor de CMI y % acumulativos frente a los antibióticos no betalactámicos estudiados.

La tabla 22 muestra CMI₅₀, CMI₉₀ y porcentaje de cepas sensibles, intermedias y resistentes para cada antibiótico no betalactámico; así como el rango.

Los porcentajes de resistencia fueron definidos como la suma de las categorías intermedia y resistente.

Para la determinación de la sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol utilizamos la técnica de difusión en placa con las tiras del Épsilon-Test (E-test).

Tabla 21.: N° de cepas con cada valor de CMI y % acumulativos. -

Antibióticos no betalactámicos		Valores de CMI															
		≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512
Gentamicina	n° de cepas				9	48	78	15	3	3	6	13	10	1	1		
	% acumul.				4,7%	30,1%	71,4%	80,4%	82,0%	83,5%	86,7%	93,6%	98,9%	99,4%	100%		
Ciprofloxacino	n° de cepas	14	13	1		5		13	9	29	23	30	23	25	4		
	% acumul.	7,4%	14,2%	14,8%	14,8%	17,4%	17,4%	24,3%	29,1%	44,4%	56,6%	72,4%	84,6%	97,8%	100%		
Fosfomicina	n° de cepas					30	109	26	2	2	2	2	5	5	3	3	
	% acumul.					15,8%	73,5%	87,3%	88,3%	89,4%	90,4%	91,5%	94,1%	96,8%	98,4%	100%	
Nitrofurantoína	n° de cepas							1	1	44	90	25	10	12	3	2	1
	% acumul.							0,5%	1,0%	24,3%	71,9%	85,1%	90,4%	96,8%	98,4%	99,4%	100%
SXT^a	n° de cepas	6	17	26	10	1	4					88					
	% acumul.	3,9%	15,1%	32,2%	38,8%	39,4%	42,0%	42,0%	42,0%	42,0%	42,0%	100%					
Tetraciclina*	n° de cepas						20	11	3			3	26	104			
	% acumul.						11,9%	18,5%	20,3%	20,3%	20,3%	22,1%	37,7%	100%			
Tigeciclina*	n° de cepas				12	40	76	38	1								
	% acumul.				7,1%	31,1%	76,6%	99,4%	100%								

^a SXT cepas testadas 152; * Tetraciclina y Tigeciclina cepas testadas 167

Tabla 22.: CMI50, CMI90 y porcentaje de cepas Sensibles, Intermedias y Resistentes para cada antibiótico, así como el rango.

Antibióticos no betalactámicos	CMI50	CMI90	Rango	% S	% I	% R
Gentamicina	1	32	0,25-256	82,0	1,6	16,4
Ciprofloxacino	16	128	≤0,03-128	17,4	6,9	75,7
Fosfomicina	0,5	16	0,5-512	94,1	2,6	3,1
Nitrofurantoína	16	64	2-512	85,1	5,3	9,5
SXT	1	32	≤0,05-32	42	-	58,0
Tetraciclina	64	128	1-128	20,3	-	79,7
Tigeciclina	0,5	2	0,25-4	99,4	0,5	-

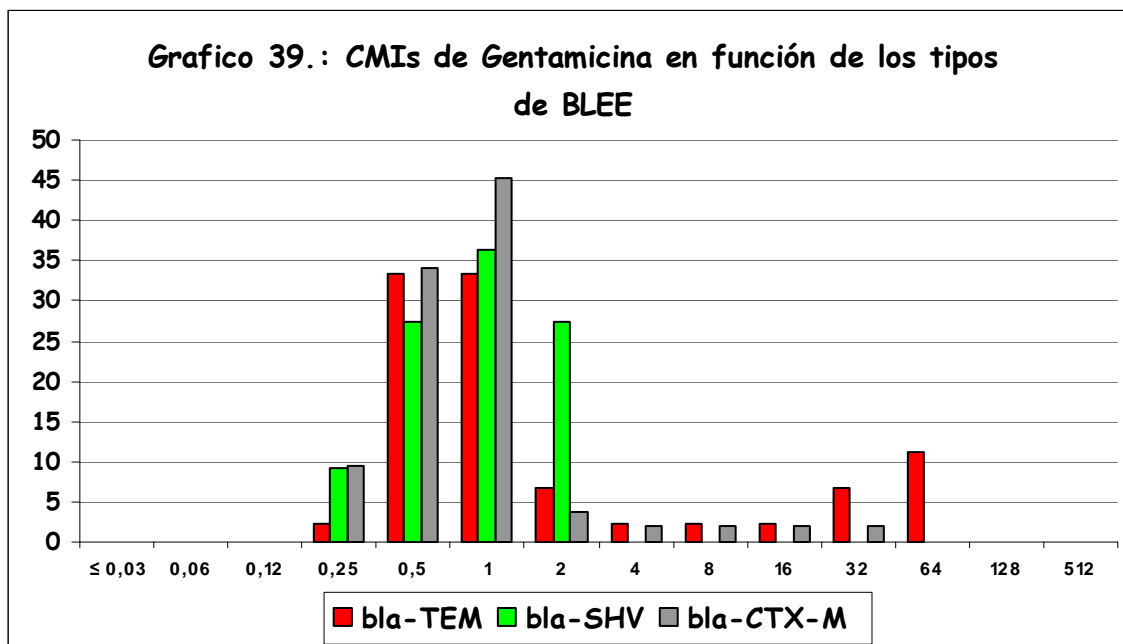
Como vemos en la tabla 22 el 18% de las cepas asoció resistencia a gentamicina, el 82,6%, un porcentaje altísimo, a ciprofloxacino, el 15% a Nitrofurantoína, el 58% a SXT y el 79,7% a tetraciclina. La resistencia fue baja para fosfomicina un 5,7% y ningún aislamiento presento resistencia a tigeciclina.

La resistencia a ciprofloxacino se asocio con resistencia a tetraciclina en 114 cepas. El fenotipo de resistencia mas frecuente fue resistencia a ciprofloxacino, tetraciclina y SXT en un 34%.

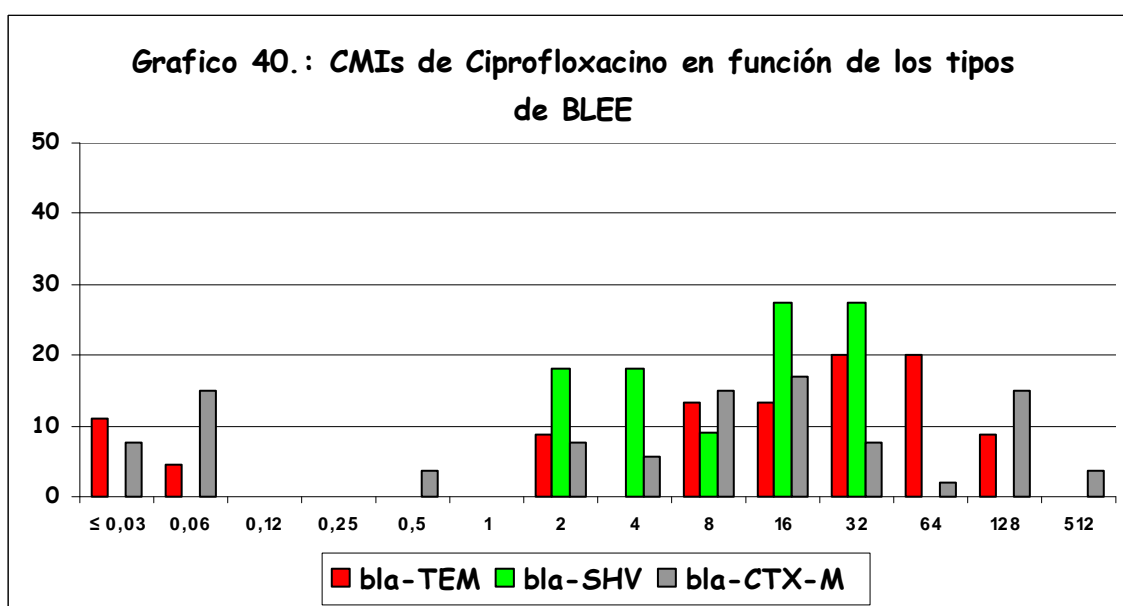
La resistencia fue múltiple en la mayoría de los casos, solamente un 10% (20/189) de las cepas estudiadas presento resistencia a solo un antibiótico no betalactámico.

6.2. Distribución según el tipo de BLEE.

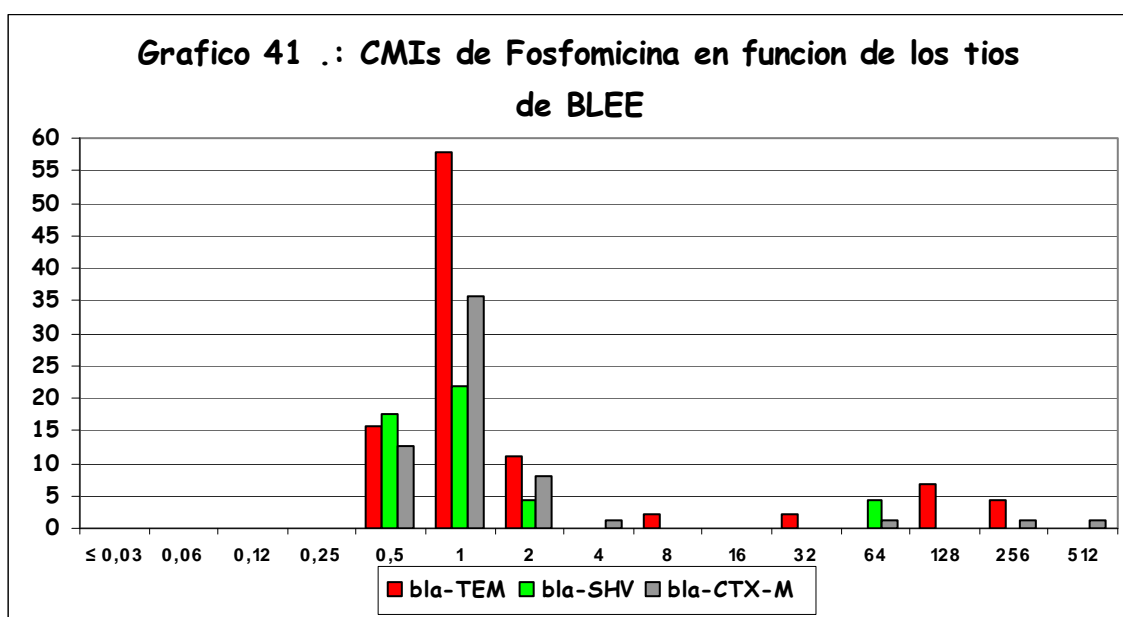
Estudiamos los porcentajes según tipo de BLEE frente a los antibióticos no betalactámicos estudiados lo que podemos ver en los gráficos 39, 40, 41, 42, 43 y 44.



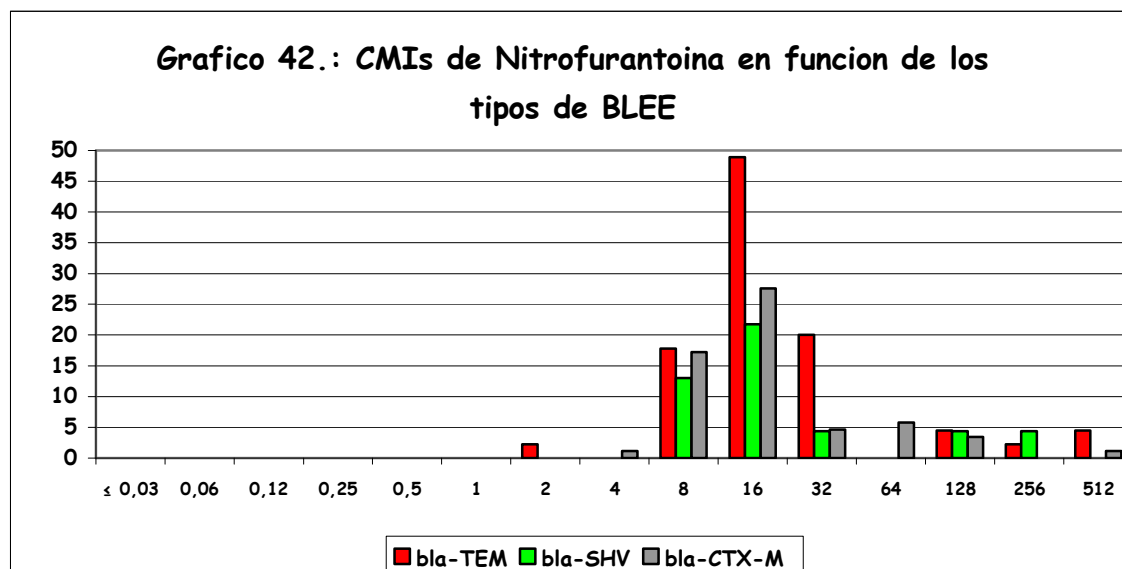
El 22%, 0% y 8% de las cepas productoras de bla-TEM, bla-SHV y bla-CTX-M respectivamente presentaron una CMI > 4 µg/ml, siendo bla-TEM, el que presento mayor porcentaje de resistencia. Las cepas que producen BLEE tipo SHV son todas sensibles a gentamicina. La resistencia a gentamicina se asocia significativamente ($p < 0,01$) al tipo TEM.



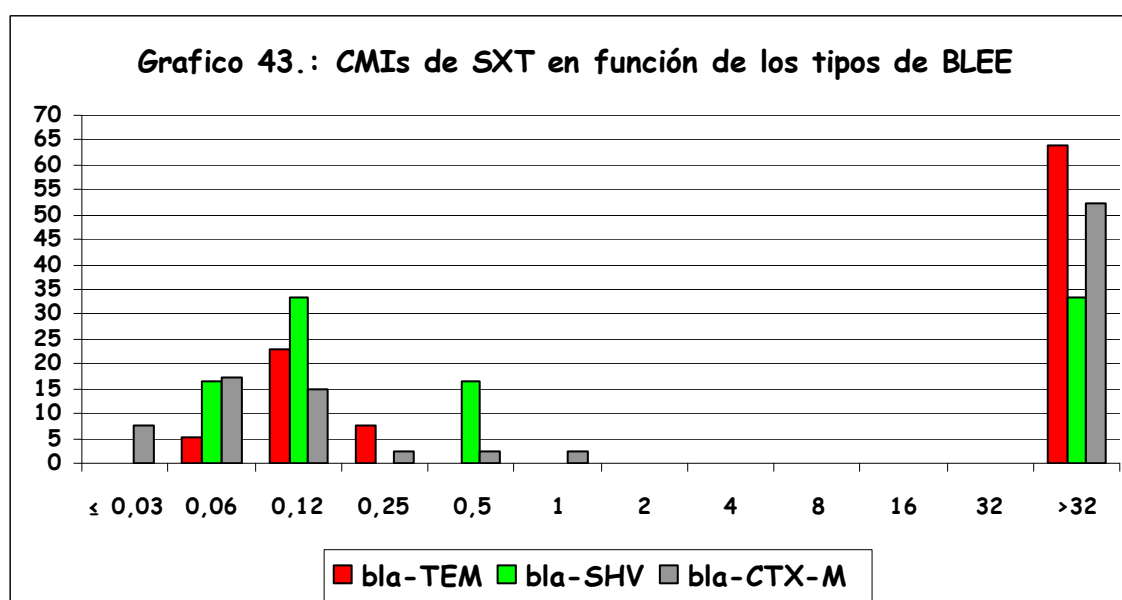
Un 84%, 100% y 74% de las cepas presentan $CMI > 1 \mu\text{g/ml}$ para bla-TEM , bla-SHV y bla-CTX-M respectivamente, siendo bla-SHV el tipo de BLEE que presento el mayor porcentaje de resistencia. No se asocio significativamente la resistencia a ciprofloxacino a ningún tipo de BLEE.



Un 11% y 6% de las cepas presentan $CMI \geq 128 \mu\text{g/ml}$ para bla-TEM , y bla-CTX-M respectivamente, siendo bla-TEM el tipo de BLEE que presento el mayor porcentaje de resistencia. Las cepas que producen BLEE tipo SHV son todas sensibles a fosfomicina. No se asocio significativamente la resistencia a fosfomicina a ningún tipo de BLEE.

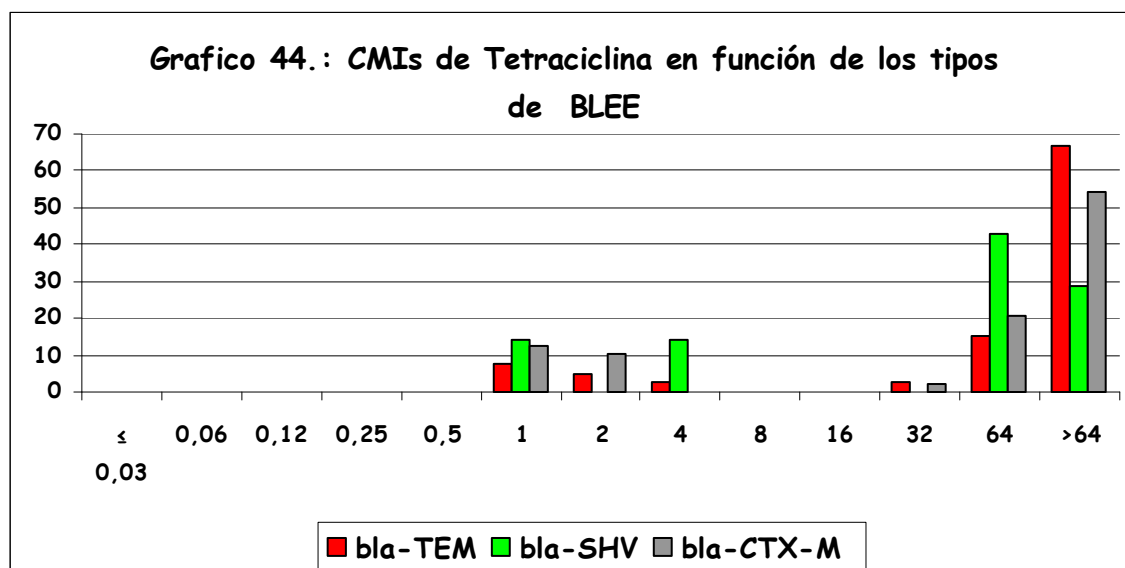


Un 11%, 9% y 10% de las cepas presentan CMI ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ para bla-TEM, bla-SHV y bla-CTX-M respectivamente, siendo bla-TEM el tipo de BLEE que presento el mayor porcentaje de resistencia. No se asocio significativamente la resistencia a Nitrofurantoína a ningún tipo de BLEE.



El 64%, 33% y 53% de las cepas productoras de bla-TEM, bla-SHV y bla-CTX-M respectivamente presentaron una CMI $> 4/76$ $\mu\text{g/ml}$, siendo bla-TEM el que presento mayor porcentaje de resistencia. No se asocio significativamente la

resistencia a SXT a ningún tipo de BLEE.



El 87%, 86% y 77% de las cepas productoras de bla-TEM, bla-SHV y bla-CTX-M respectivamente presentaron una CMI > 4 µg/ml, siendo bla-TEM y bla-SHV los que presentaron mayor porcentaje de resistencia.

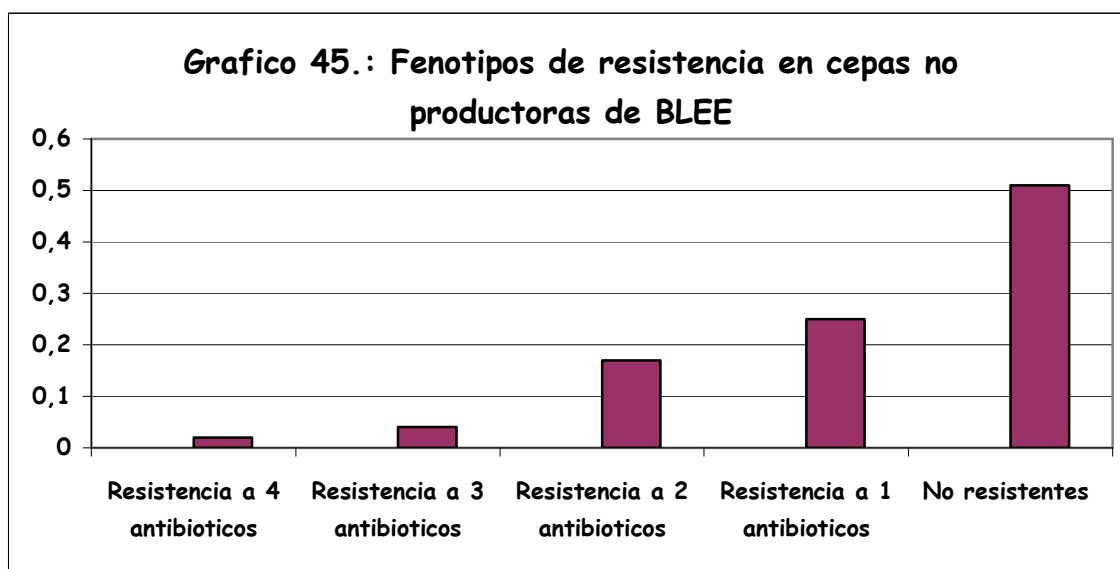
6.3. Comparación de resistencias con un grupo control

Hemos recogido los resultados de sensibilidades a gentamicina, ciprofloxacino, fosfomicina, Nitrofurantoína y SXT de 189 cepas tomadas al azar aisladas durante el mismo año y no productoras de BLEE. Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 23.

Tabla 23.: nº de cepas sensibles, intermedias y resistentes de las cepas no productoras de BLEE

nº cepas/antibióticos	S	I	R	%R
Gentamicina	176	-	13	7
Ciprofloxacino	133	3	53	30
Fosfomicina	182	-	4	4
Nitrofurantoína	185	0	4	2
SXT	115	-	74	39

Se encontraron los siguientes fenotipos de resistencia entre las cepas no productoras de BLEE (ver grafico 45).



No encontramos ninguna cepa resistente a todos los antibióticos testados.

Un 2% (4/189) de las cepas estudiadas fueron resistentes a **4 antibióticos**, 2 cepas resistentes a gentamicina, SXT, ciprofloxacino y fosfomicina y 2 cepas resistentes a SXT, Nitrofurantoína, ciprofloxacino y fosfomicina.

Un 4% (8/189) de las cepas estudiadas fueron resistentes a **3 antibióticos**, 6 cepas resistentes a gentamicina, SXT, ciprofloxacino; 1 cepa resistente a SXT, Nitrofurantoína, ciprofloxacino; 1 cepa resistente a SXT, ciprofloxacino y fosfomicina;

Un 17% (33/189) de las cepas estudiadas fueron resistentes a **2 antibióticos**, 25 cepas resistentes a SXT y ciprofloxacino; 1 cepa resistente a Nitrofurantoína y ciprofloxacino; 2 cepas a ciprofloxacino y fosfomicina; 4 cepas a gentamicina y SXT; 1 cepa a gentamicina y ciprofloxacino.

Un 25% (48/189) de las cepas estudiadas fueron resistentes a **1 antibiótico**, 33 cepas resistentes a SXT y 15 cepas resistentes a ciprofloxacino.

Un 51% (96/189) cepas presentaron sensibilidad a todos los antibióticos testados

Son significativas las asociaciones de ciprofloxacino con gentamicina, SXT,

Nitrofurantoína y fosfomicina y también de SXT con gentamicina.

Hemos comparado los valores de resistencia de este grupo con los obtenidos para nuestras cepas productoras de BLEE, los cuales fueron 18%, 82,6%, 5,7%, 14,8% y 58% frente a gentamicina, ciprofloxacino, fosfomicina, Nitrofurantoína y SXT respectivamente. La relación entre producción de BLEE y mayor porcentaje de resistencias ha sido significativa para gentamicina, ciprofloxacino, Nitrofurantoína y SXT, no lo ha sido para fosfomicina. El resultado ha sido indistinto considerando a las cepas intermedias como resistentes o excluyéndolas.

7. Caracterización de la resistencia a quinolonas

Como comentamos anteriormente, se obtuvo un porcentaje de no sensibilidad a ciprofloxacino del 82,6% (156/189). Los datos de las CMI_{50} y CMI_{90} se detallaron en la tabla 22. Al ser un porcentaje tan alto buscamos una relación estudiando los genes *qnr* de resistencia plasmídica a quinolonas.

Se estudiaron los genes *qnrA*, *B* y *S*, siendo todas las cepas negativas para *qnrA* y *S*. La cepa 163 amplificó con *qnr B* que posteriormente tras su secuenciación resultó ser *qnr B19*. Esta cepa fue productora de BLEE tipo SHV-12.

En esta cepa, que presentó una CMI a ciprofloxacino de 16 $\mu\text{g/ml}$, los genes *gyrA* y *parC* fueron amplificados, mediante PCR, con sus tamaños respectivos de 626 pb y 964 bp. Posteriormente se secuenciaron sus genes *gyrA* y *parC* y se observaron las mutaciones siguientes en las proteínas codificadas:

Cepa	CMI Ciprofloxacino ($\mu\text{g/ml}$)	Mutaciones <i>GyrA</i>		Mutaciones <i>ParC</i>	
		Ser83	Asp87	Ser80	Glu84
163	16	Leu	Asn	Ile	-

8. Secuenciación

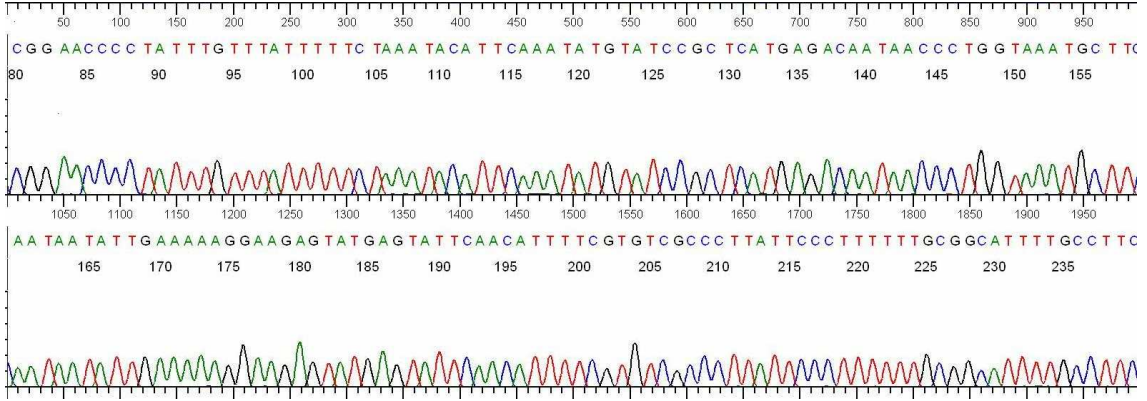
Se enviaron a secuenciar a la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid un total de 39 cepas representativas de los diferentes tipos, familias, pIs y fenotipos de resistencia.

Se pudieron identificar 25 secuencias; ver tabla 25.

Tabla 25.: Cepas BLEE secuenciadas

nº cepa	Tipo de BLEE secuenciada
163	SHV-12 / qnr B-19
169	TEM-1 / SHV-12
179	TEM-1 / SHV-12
60	TEM / CTX-M-14
109	TEM / CTX-M-9
113	TEM / CTX-M-14
144	TEM / CTX-M-14
149	TEM-3 / CTX-M-14
150	TEM / CTX-M-14
135	TEM-24 / CTX-M-15
146	TEM-1 / CTX-M-15
170	CTX-M-1
194	TEM / CTX-M-15
5	TEM-1 / CTX-M grupo no 9
27	TEM-4
29	TEM-4
47	TEM-1
53	TEM-1/SHV
54	TEM-1/SHV/CTX-M
90	TEM-10
91	TEM-1 / CTX-M grupo no 9
97	TEM-1/SHV/CTX-M
105	TEM-1 / CTX-M grupo 9
125	TEM-1
195	TEM-1 / CTX-M grupo no 9

Secuencia de una BLEE



9. Epidemiología de las cepas

9.1. Distribución de las cepas en función de su procedencia

Las cepas aisladas de pacientes de origen comunitario fueron 127/189, lo cual supone un 67%, distribuidas de la siguiente manera por centros periféricos y consultas del hospital (ver tabla 26).

Tabla 26.: Distribución de aislamientos por centros periféricos y consultas

Centro periférico o consulta	nº de aislamientos
Modesto La fuente	23
Avenida de Portugal	53
Urgencias hospitalarias	29
Consultas:	22
• Urología	8
• Trasplantes	8
• Oncología	2
• Geriatría	2
• Diálisis	1
• Nefrología	1
Totales	127

La distribución por áreas de las cepas aisladas de muestras de pacientes hospitalarios queda reflejada en la tabla 27. En total se aislaron 62 cepas de 189 lo que supone un 33%.

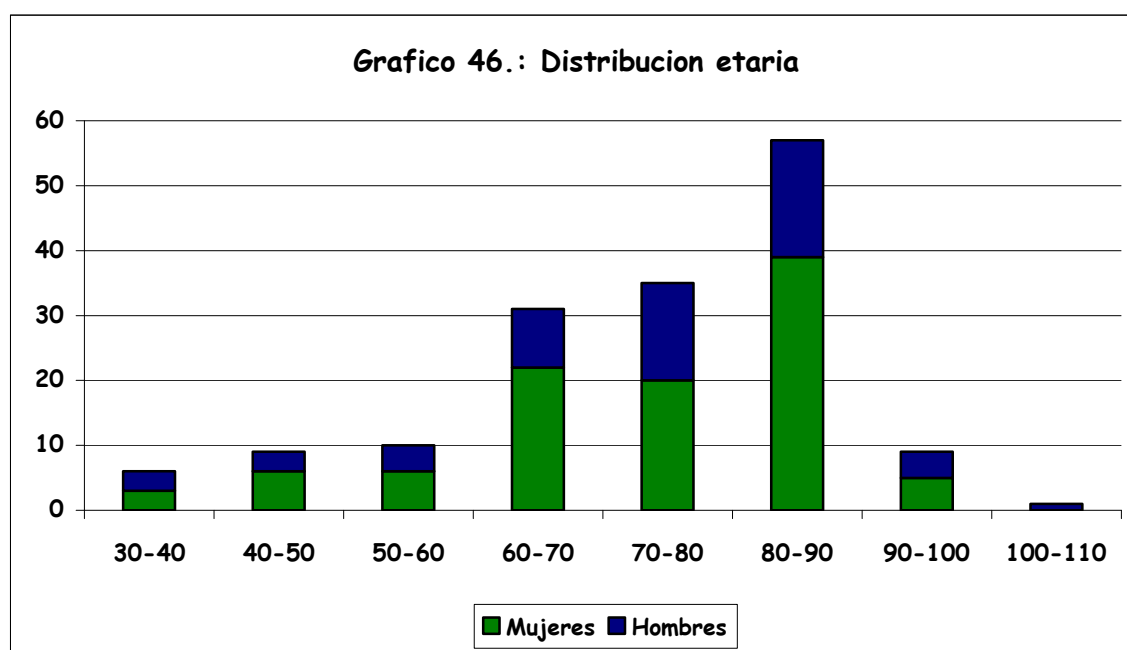
Tabla 27.: Distribución de aislamientos por áreas.

Áreas	n° aislamientos
Alto riesgo	9
Medicas	50
Quirúrgicas	3
Totales	62

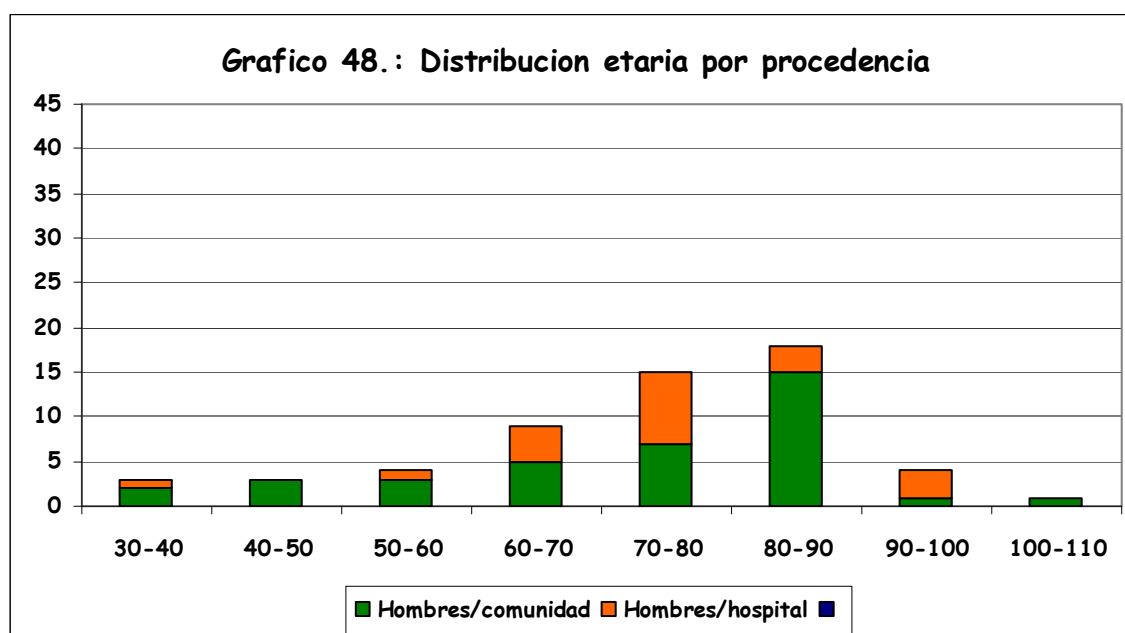
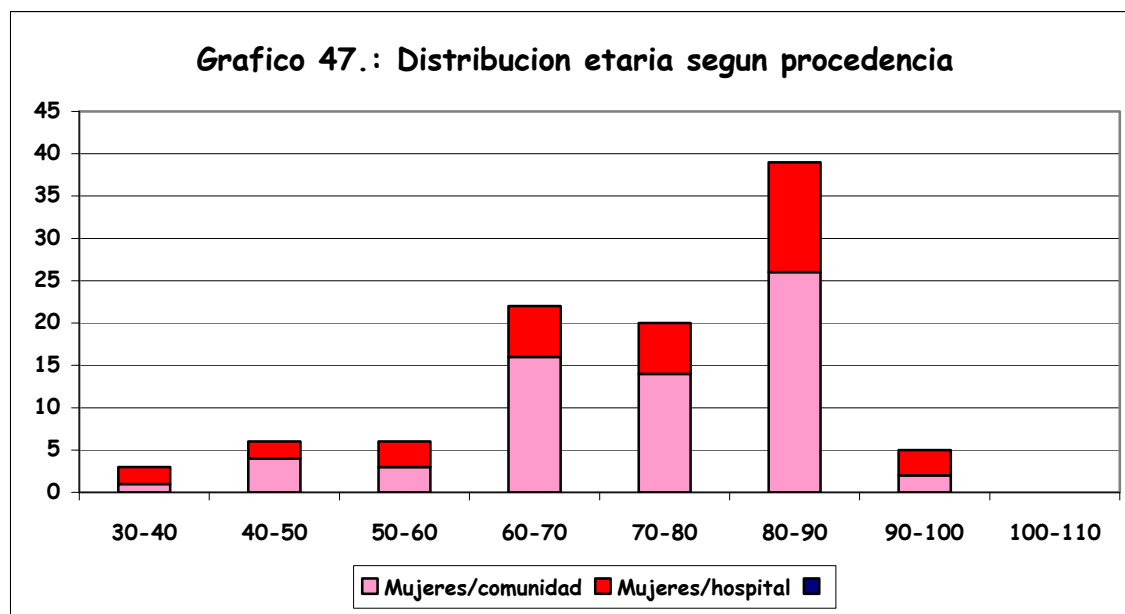
Como queda reflejado en las tablas 26 y 27 el porcentaje de cepas de origen comunitario es superior a las cepas de origen hospitalario

9.2. Distribución de los pacientes en función de la edad

La media de edad de los pacientes estudiados fue de 68,5 años, con un rango de 31-106 años. Un 65% de los pacientes fueron mujeres y un 35% hombres. (Grafico 46)



La distribución etaria en función de la procedencia (hospital, comunidad) y del sexo (mujeres, hombres) puede verse en los gráficos 47 y 48.



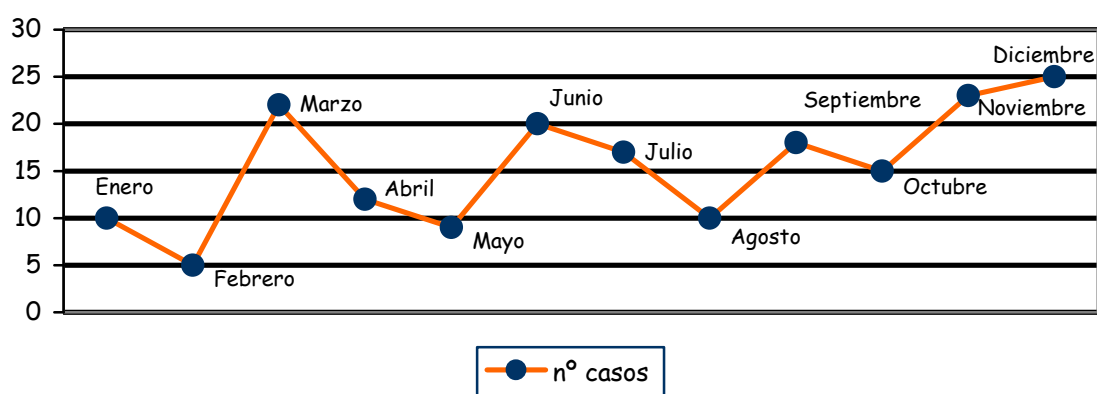
Como se observa en los gráficos 47 y 48 en el rango de los 80-90 años es donde se encuentra el mayor porcentaje de mujeres y hombres procedentes de la comunidad.

9.3. Distribución de los aislamientos en función de la fecha

La distribución de los aislamientos en función de la **fecha** en la que se aisló la

cepa podemos verla en la grafico 49. Es muy homogénea. El mayor número de casos se observa en el mes de diciembre (con 25 casos) seguido del mes de noviembre (23 casos), marzo (22 casos) y junio (20 casos). En 5 casos no nos consta la fecha de aislamiento.

Grafico 49.: Distribución de casos durante el periodo de estudio (año 2005)



9.4. Distribución de los tipos de BLEE según procedan de la comunidad o del hospital

La distribución de los tipos de BLEE según procedan de la comunidad o del hospital fue la siguiente: en el ámbito **hospitalario** se detectaron bla-TEM, bla-SHV y bla-CTX-M en 25, 8 y 39 cepas respectivamente, (la suma es superior a 62 debido al elevado numero de cepas que producían dos BLEE simultáneamente), lo que representa un 34,7%, 11,1% y 54,1% respectivamente. En el ámbito **extrahospitalario** se detectaron en 38, 24 y 75 cepas respectivamente, (la suma es superior a 127 debido al elevado número de cepas que producían dos BLEE simultáneamente) lo que representa 27,7%, 17,5%, 54,7% respectivamente como podemos ver en los gráficos 50 y 51.

Grafico 50.: Cepas hospital: Genes caracterizados por PCR.

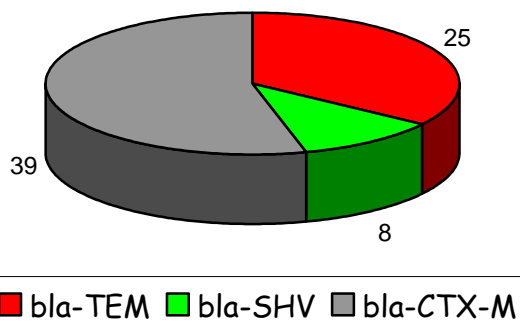
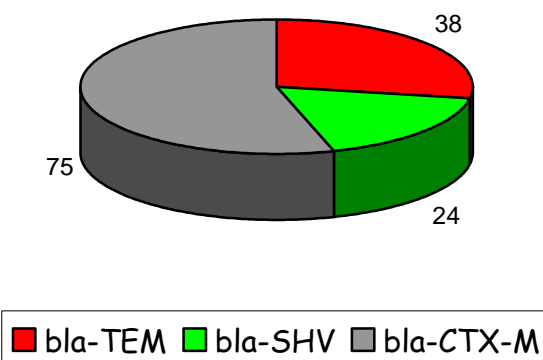
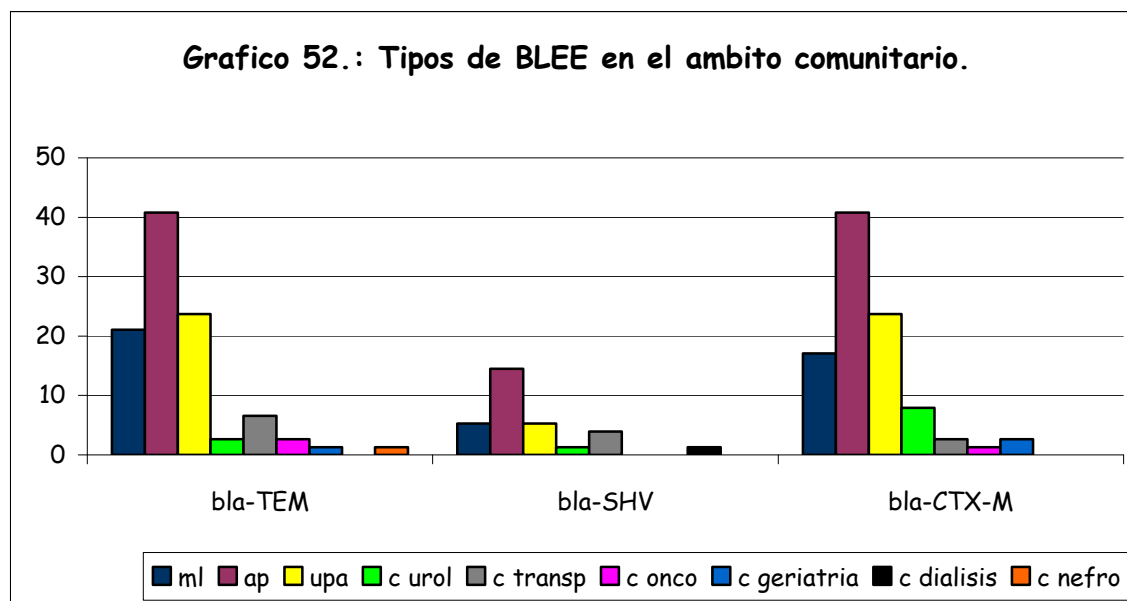


Grafico 51.: Cepas comunidad: Genes caracterizados por PCR.





Como vemos en el grafico 52 el centro de atención sanitaria donde se aisló el mayor porcentaje de cepas productoras de BLEE fue la Avenida de Portugal seguido de las urgencias hospitalarias.

9.5. Análisis del genotipado por RAPD

Hemos encontrado un alto grado de heterogeneidad genética, como se observa en el análisis del genotipado por RAPD. Se encontraron 57 patrones clonales que presentan desde un máximo de 8 bandas hasta una sola y con Pm entre 2100 pb y 100 pb. En la figura 15, vemos un gel con los resultados de 35 de los aislados. En la figura 16, los 19 patrones encontrados en estas 35 cepas y en la figura 17 los patrones de las cepas productoras de BLEE tipo SHV.

Figura 15.: Bandas presentadas en 35 de los aislados

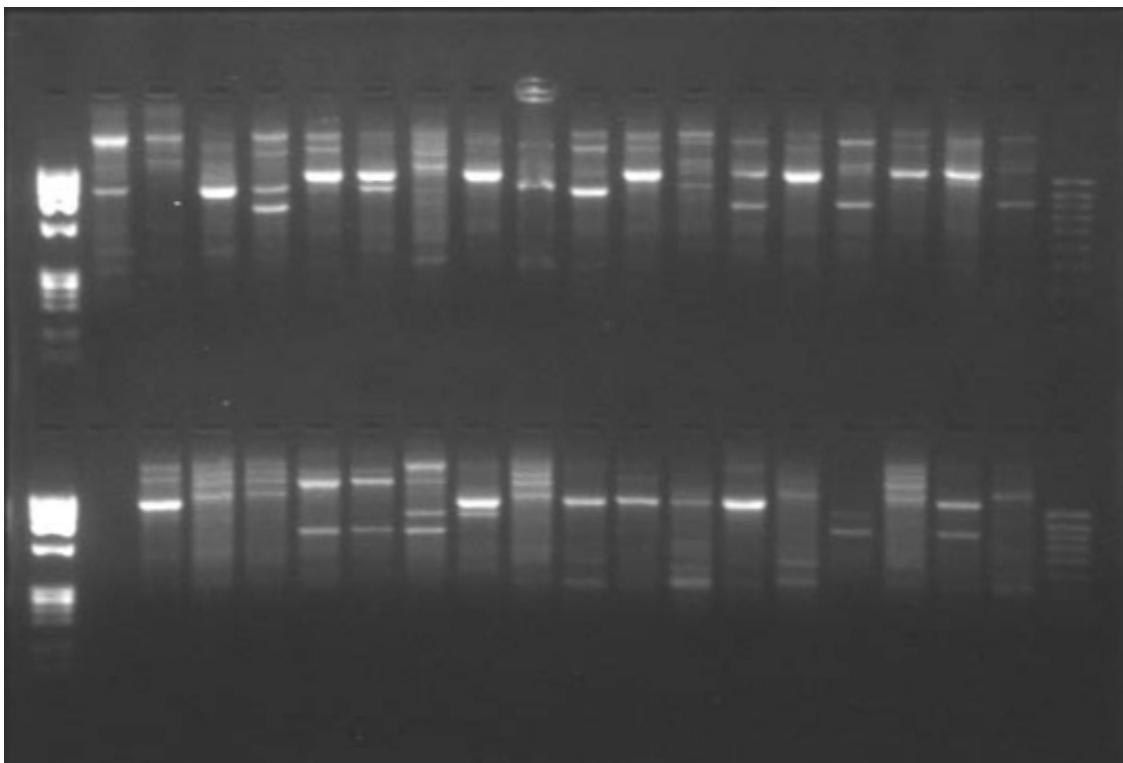


Figura 16.: Patrones encontrados en estas 35 cepas

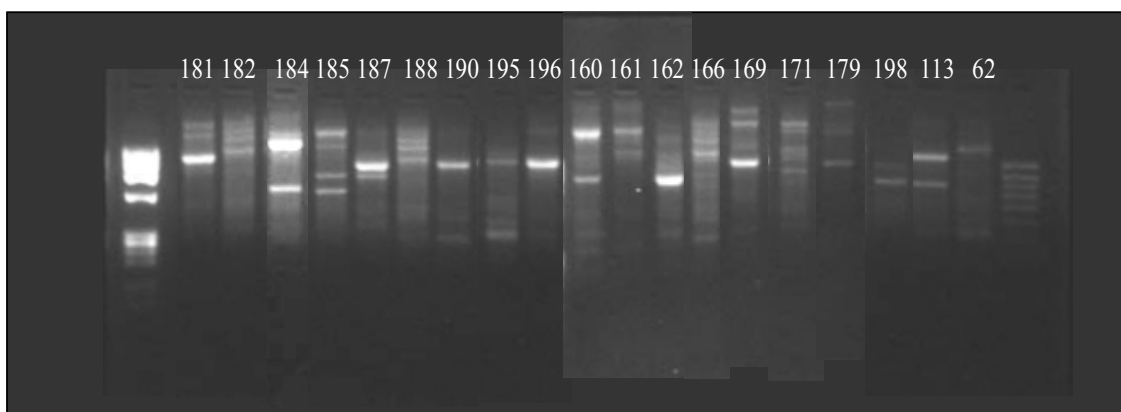
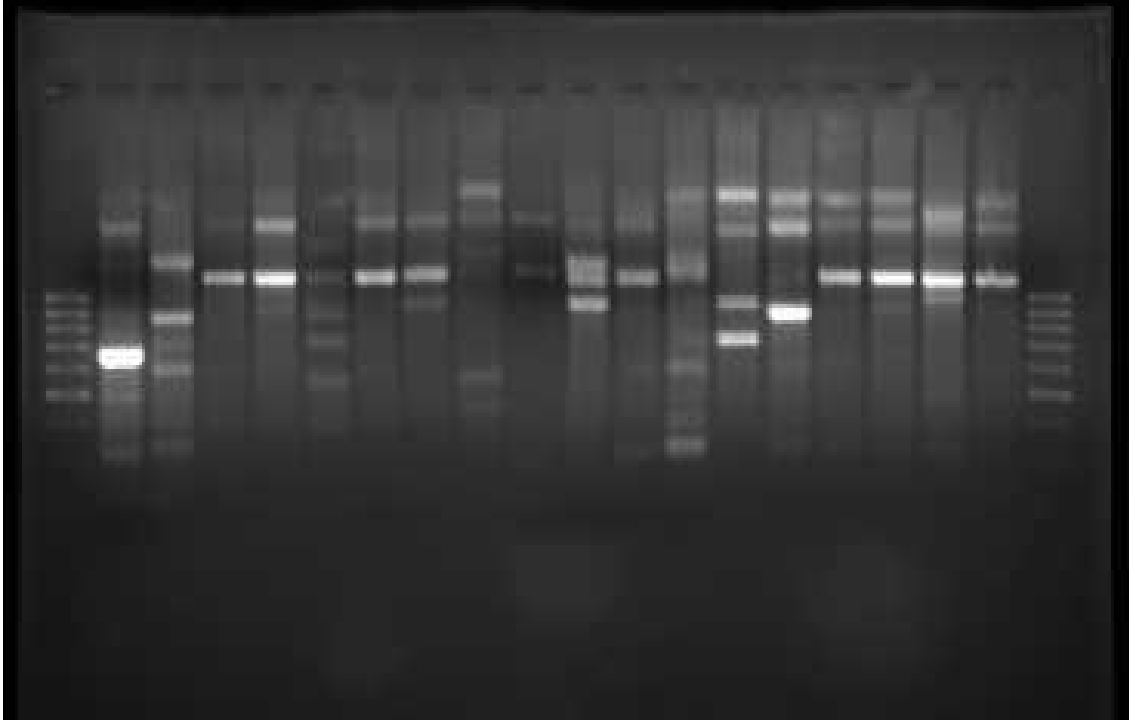


Figura 17.: RAPD BLEE tipo SHV



Discusión

1. Prevalencia global

Los datos de nuestro trabajo indican durante el periodo estudiado (año 2005) una prevalencia del 3,7% de cepas de *E.coli* productoras de BLEE entre los aislados de orina de nuestra Área de salud.

Es importante reseñar, al comparar los datos de prevalencia, que existen importantes diferencias en el diseño de los estudios realizados, ya que algunos estudios son multicéntricos, otros son relativos a todo tipo de muestras y otros se centran en ámbitos concretos. Tampoco hay que olvidar que las diferencias entre distintos países y años pueden ser debidas a brotes epidémicos (De Champs, Sirot et al. 2000)

Los estudios de vigilancia como el Proyecto SENTRY y MYSTIC proporcionan información sobre la prevalencia de resistencia bacteriana producida por diferentes mecanismos incluyendo las BLEE. (Goossens, Malhotra-Kumar et al. 2004)

En el estudio SENTRY, 1997-1999 realizado para conocer la prevalencia mundial de BLEE se obtuvieron los siguientes resultados referentes a aislados de *E.coli* en orina de pacientes hospitalizados, el porcentaje de *E.coli* con fenotipo de BLEE teniendo en cuenta las CMI's a ceftazidima fueron los siguientes: la mayor prevalencia se encontró en América latina con un 8%, Asia 7,1% Canadá 3,3%, USA 2,3% y Europa con un 4,1% (Winokur, Cantón et al. 2001). Recientes datos obtenidos de este programa de vigilancia indican que en Europa el 1,3% de las cepas de *E.coli* de pacientes hospitalizados son productoras de BLEE, oscilando entre los diferentes países con un 0,3% en España. (Nijssen, Florijn et al. 2004)

Estudios realizados en Francia por De Champs y cols en 1990, 1991, 1996 y 1998 obtienen en cepas *E.coli* prevalencias de producción de BLEE del 1,5%, 0,9%, 0,1% y 0,2% respectivamente. (De Champs, Sirot et al. 2000)

En la encuesta MYSTIC, realizada en 2002 con 49 participantes de 25 países,

se obtiene una prevalencia global de BLEE en *E.coli* del 9%. (Goossens, Malhotra-Kumar et al. 2004)

En el estudio SMART realizado en 2004 al menos el 10% de las cepas de *E.coli* aisladas de infecciones intra-abdominales eran portadoras de BLEE, constatándose un alarmante aumento de portadores fecales de *E.coli* productores de BLEE desde 1991 a 2003 (Cantón, Novais et al. 2008) (Valverde, Coque et al. 2004)

Estudios de vigilancia realizados por Albertini y cols en hospitales Franceses durante los años 1996-2000 obtienen que las principales especies involucradas en la producción de BLEE fueron *E. aerogenes* (50%) y *K. pneumoniae* (26,5%), junto con otras especies con una incidencia menor del 25% como *E.coli*. (Albertini, Benoit et al. 2002)

En España, en el primer estudio nacional de aislados clínicos de BLEE, realizado por Hernández y cols se obtuvo una prevalencia de un 0,5% de BLEE en cepas de *E.coli*, (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005) lo cual coincide con otros autores en Italia y Francia con porcentajes de 1,2% y 0,2% respectivamente (De Champs, Sirot et al. 2000; Spanu, Luzzaro et al. 2002; Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005)

Estudios realizados en 2006 en España hablan de tasas de un 6% de aislados de *E.coli* portadores de BLEE. (Cantón, Novais et al. 2008)

2. Origen de las cepas Hospital/Comunidad

En nuestro estudio encontramos un porcentaje mayor de cepas aisladas de pacientes de origen comunitario, un 67%, que de muestras de pacientes hospitalizados, un 33%.

Siendo, en el hospital, la distribución por servicios la siguiente: 14% correspondió al área de alto riesgo, un 81% al área médica y un 5% al área de cirugía.

La distribución de los tipos de BLEE según procedencia comunitaria u hospitalaria fue la siguiente: en el ámbito hospitalario se detectaron un 34,7%,

11,1% y 54,1% de bla-TEM, bla-SHV y bla-CTX-M respectivamente. En el ámbito extrahospitalario los porcentajes fueron de 27,7%, 17,5%, 54,7% de bla-TEM, bla-SHV y bla-CTX-M respectivamente.

En los últimos años se ha detectado un aumento de enterobacterias portadoras de BLEE en el ámbito comunitario siendo muy importante el papel que juegan los laboratorios de microbiología en su detección y control. (Pitout, Nordmann et al. 2005)

Existen numerosos estudios realizados en diferentes países y en diferentes años que informan de este aumento. El primer informe data de 1998, en Irlanda, donde se aisló una cepa de *E.coli* resistente a ciprofloxacino y portadora de BLEE en la orina de un paciente sin antecedentes de hospitalización. (Cormican, Morris et al. 1998)

En el año 2000, estudios realizados en Arabia y Francia también detectan un aumento de resistencias en cepas aisladas de pacientes no ingresados. (Pitout, Nordmann et al. 2005).

En 2001 Rodríguez-Baño y cols estudian la epidemiología y las características clínicas de las infecciones producidas por cepas de *E.coli* portadoras de BLEE en pacientes no hospitalizados. Estudian 49 pacientes sin historia de ingreso en las 48 horas o más previas al aislamiento, con los siguientes factores de riesgo: Diabetes mellitus, uso previo de fluoroquinolonas en los dos meses previos, ingreso hospitalario en el año previo, ITU recurrentes, sexo masculino y edad avanzada. El 1,4% de los aislamientos corresponden a muestras de orina. (Rodríguez-Baño, Navarro et al. 2004)

Asimismo estudios realizados en Israel informan de una prevalencia de un 1,25% de cepas portadoras de BLEE en bacilos gram-negativos en muestras de orina procedentes de pacientes comunitarios (Colodner, Keness et al. 2001).

En 2002 en España se detecta CTX-M-14 en 7 pacientes con ITU y sin antecedentes de ingreso hospitalario. (Bou, Cartelle et al. 2002). En este mismo año estudios realizados en USA e Israel en pacientes ambulatorios informan

también de aislamientos de cepas productoras de BLEE. (Pitout, Nordmann et al. 2005)

Durante 2003 y 2004 se realizaron numerosos estudios en pacientes no hospitalizados la mayor parte de ellos con ITU detectándose aumento de cepas portadoras de BLEE. (Pitout, Nordmann et al. 2005).

Arpin y cols estudian el posible origen en cinco pacientes de ITU adquirida en la comunidad producida por enterobacterias portadoras de BLEE, en todos los casos los pacientes tienen antecedentes de ingreso hospitalario y existe relación clonal entre las cepas aisladas en estos pacientes y las cepas aisladas en pacientes hospitalizados, de lo que deducen el origen nosocomial de estas infecciones (Arpin, Dubois et al. 2005) (Arpin, Coulange et al. 2007)

En estudios multicéntricos realizados por Hernández y cols en hospitales españoles el mayor porcentaje de *E.coli* provenía de los servicios de medicina y cirugía y un 1,3% del total de las cepas de *E.coli* aisladas en UCI eran portadoras de BLEE (Hernández, Pascual et al. 2003) Existen pocos datos en la literatura sobre prevalencia de *E.coli* en UCI.

Estudios realizados en Francia por De Champs y cols en 1998, aíslan enterobacterias productoras de BLEE en un 7,1% en UCI, 1,6% en áreas de oncológica y un 7,7% en áreas de rehabilitación. Siendo el 2,9% muestras de orina.

Estudios multicéntricos realizados por Hernández y cols en el año 2000 en 40 hospitales españoles, hablan de porcentajes de un 51% de *E.coli* productoras de BLEE en pacientes de origen extrahospitalario. Los servicios de donde proceden las muestras con *E.coli* productoras de BLEE fueron: medicina (39,5%), cirugía (27%), UCI (15%), pediatría (7,5%) y otros (11%). Las cepas de *E.coli* se aislaron de orina en un 66%. (Hernández, Pascual et al. 2003)

3. Según el tipo de BLEE

En nuestro estudio, ninguna de las cepas amplificó con los tres tipos de BLEE estudiados TEM+SHV+CTX. Las combinaciones fueron con TEM-1 en 5 casos. Un

15% (27/182) presento dos tipos de BLEE: el 10% (18/182) los tipos TEM+CTX-M y el 5% (9/182) los tipos SHV+CTX-M. Resultados similares a los obtenidos por otros autores. El 85% (155/182) amplificó con un solo tipo de BLEE. El 25% (45/182) el tipo TEM, el 13% (23/182) el tipo SHV y el 48% (87/182) el tipo CTX-M exclusivamente. El tipo de BLEE más prevalente fue CTX-M.

En un estudio prospectivo multicéntrico sobre aislamientos de 170 *E.coli* productores de BLEE en el año 2000 realizado por Hernández y cols, se detectaron BLEE tipo TEM en 132 aislados (77,6%), 64 tipo SHV (37,6%) y 85 tipo CTX-M (50%), de las cuales 24 fueron CTX-M-9 (27,3%) (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005)

Estudios multicéntricos realizados en Italia en 2001 obtienen como tipo de BLEE más prevalente en enterobacterias TEM seguido de SHV, combinaciones TEM-SHV y por último CTX-M. También aíslan otros tipos de BLEE menos comunes como SFO-1, TLA-1, VEB-1 y BES-1 (Spanu, Luzzaro et al. 2002)

Romero y cols en *E.coli* productores de BLEE obtienen que un 17% de los aislados produzcan más de una enzima (48 con dos genes y 5 con tres). (Romero, López et al. 2005)

3.1. Cepas productoras de CTX-M

En este estudio hemos encontrado que un 60% de las cepas estudiadas eran productoras de CTX-M, siendo el 46% CTX-M grupo 9.

Los primeros informes de aislamientos de cepas productoras de CTX-M datan de mediados de los años 80 provenientes de Japón, Europa y Argentina (Bonnet 2004), produciéndose a partir de 1995 un incremento en sus aislamientos en América latina, Asia y Europa en diferentes especies de enterobacterias e incluso en algunos ambientes han superado los aislamientos debidos a betalactamasas tipo TEM y SHV como por ejemplo en Taiwán con un porcentaje de un 89,7% de las cepas de *E.coli* portadoras de CTX-M (Rossolini, D'Andrea et al. 2008)

Esta diseminación masiva denominada "pandemia CTX-M" es uno de los mejores

ejemplos de la rápida extensión de la resistencia mediada por plásmidos entre las bacterias. Recientes estudios de vigilancia informan de altos porcentajes de aislamientos en cepas de *E.coli* en Europa, Asia y América del Sur, por ejemplo en España en el año 2002 se obtienen tasas de un 52,3%. (Rossolini, D'Andrea et al. 2008) (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005), coincidiendo con datos obtenidos en Italia donde se reportan un 54,8% en aislados de *E.coli*. (Luzzaro, Mezzatesta et al. 2006)

Asimismo estudios realizados en Reino Unido notifican aumentos desde un 1,8% en 2001 a 7,5% en 2004 en cepas de *E.coli*. (Livermore, Cantón et al. 2007).

Arpin y cols en estudios realizados en 1999 y en 2004 en diferentes centros de salud privados en Francia informan del incremento de los aislamientos de CTX-M en 2004 en relación con 1999 24,5% vs. 2,9%. (Arpin, Coulange et al. 2007)

3.1.1. Cepas productoras de CTX-M grupo 9

En nuestro estudio obtenemos un porcentaje de un 46% de cepas productoras de CTX-M grupo 9 correspondiendo un 76% (39/51) a muestras extrahospitalarias y un 24% (12/51) a muestras de pacientes ingresados. Llamando nuevamente la atención el alto porcentaje obtenido en muestras comunitarias. Obtenemos un porcentaje mayor que en los estudios de Rodríguez-Baño y cols en 2001-2002. (Rodríguez-Baño and Paterson 2006)

En el año 2000 Sabaté y cols describen la secuencia de aminoácidos de CTX-M-9 en una cepa de *E.coli* aislada de la orina de una mujer de 65 años con ITU y diabetes mellitus tipo 2. (Sabate, Tarrago et al. 2000) En ese mismo año Hernández y cols obtienen un 27,3% de aislados de *E.coli* portadores de CTX-M-9 en un estudio multicéntrico realizado en 40 hospitales españoles (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005).

Valverde y cols en el año 2003 estudian la prevalencia de BLEE en muestras fecales de 304 pacientes extrahospitalarios e intrahospitalarios correspondiendo un 21.4 % al tipo CTX-M-9. (Valverde, Coque et al. 2004).

Kim y cols describen por primera vez en Corea la presencia de CTX-M-9 en aislados de enterobacterias en pacientes hospitalizados. (Kim, Lim et al. 2005)

También se han informado cepas productoras de CTX-M-9 en China. (Chanawong, M'Zali et al. 2002). Asimismo, se han aislado cepas de *E.coli* portadoras de CTX-M-9 en heces de animales tanto sanos como enfermos lo que ha sido descrito por Briñas en 2003. (Brinas, Moreno et al. 2005).

Rodríguez-Baño y cols obtienen un 64% de cepas productoras de CTX-M-9 en un estudio realizado sobre 49 pacientes extrahospitalarios. (Rodríguez-Baño, Navarro et al. 2004)

4. Relación clonal

No se encontró relación clonal entre los aislados lo que coincide con otros estudios.

En un estudio realizado en Sevilla durante 2001 y 2002 en 49 pacientes no hospitalizados con infecciones por *E.coli* productora de BLEE, no se encontró ninguna relación clonal entre los aislados. (Rodríguez-Baño, Navarro et al. 2004)

Un estudio nacional realizado en España en 2000 encuentra que dentro de los 40 hospitales participantes en 37 los aislamientos de *E.coli*-BLEE fueron no relacionados clonalmente y en 3 centros más de un aislamiento presentó el mismo patrón. (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005)

5. Resistencias a betalactámicos

En cuanto a **Amoxicilina/clavulánico (A/C)**, en nuestro estudio obtuvimos un 58,7% de cepas sensibles y un 4,8% de cepas resistentes. Llamando la atención el elevado porcentaje de cepas intermedias, un 36,5%.

Rodríguez-Baño y cols obtienen un 48% de cepas sensibles, este autor concluye (Rodríguez-Baño 2007) que A/C no es útil para uso empírico por el alto porcentaje de cepas no sensibles, pero si es de potencial utilidad como alternativa tras estudio de sensibilidad con el objetivo de reducir el consumo de carbapenemes.

Ellos tratan 11 pacientes con bacteriemia por *E.coli* productor de BLEE y 10 curaron. (Rodríguez-Baño, Navarro et al. 2004; Rodríguez-Baño, Navarro et al. 2006)

Hernández y cols en un estudio multicéntrico realizado en España en 170 aislados de *E.coli* en 2000 obtienen un 69% cepas sensibles (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005)

De Cueto y cols, obtienen un 88,3% de cepas sensibles en un estudio realizado sobre 290 *E.coli*. (de Cueto, Hernández et al. 2006)

Calbo y cols en un estudio realizado en pacientes procedentes de la comunidad con ITU producidas por *E.coli* productores de BLEE obtienen un 94,8% de cepas sensibles. (Calbo, Romaní et al. 2006)

Otro estudio realizado en Corea en 307 *E.coli* aislados de orina y sangre encuentran un 67,8% de cepas sensibles. (Ko, Suh et al. 2007)

En un estudio realizado en Italia en 1999, en aislados de enterobacterias productoras de BLEE, de pacientes hospitalizados obtuvieron un 15% de cepas sensibles a A/C. (Spanu, Luzzaro et al. 2002)

Hay publicado un caso de cistitis por *E.coli* productor de CTX-M-15, resistente a SXT y ciprofloxacino tratado con A/C (teniendo una CMI de 32/16) con éxito. Explican que los niveles alcanzados en orina y la farmacocinética lo explican. Concluyen que parece razonable considerarlo una opción para el tratamiento de pacientes extrahospitalarios con cistitis no complicada cuando fallan los tratamientos orales de primera línea. (Lagace-Wiens, Nichol et al. 2006)

Paterson, considera que las combinaciones antibióticas betalactámico/inhibidor de betalactamasa pueden ser una opción en el tratamiento de las ITU por cepas sensibles. (Paterson 2000; Paterson and Bonomo 2005)

En relación a **cefoxitina** nosotros obtuvimos un 91% de cepas sensibles y un 9% de cepas con sensibilidad intermedia. Nuestros resultados son algo más altos que los encontrados por otros autores.

Hernández y cols obtienen un 76,5% de cepas sensibles en 170 aislados de

E.coli productores de BLEE. (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005)

En el estudio SMART, en España en 37 aislados de *E.coli* productores de BLEE un 81,1% de cepas fueron sensibles. (Baquero, Cercenado et al. 2006) El mismo estudio pero a nivel mundial obtiene un 62,2% de cepas sensibles. (Paterson, Rossi et al. 2005). En el estudio SENTRY a nivel mundiales 70 aislados de *E.coli* productores de BLEE un 11% de los aislados fueron sensibles a cefoxitina. (Schwaber, Navon-Venezia et al. 2005)

En relación a **Cefotaxima** obtuvimos un 48,1% de cepas sensibles, un 17% con sensibilidad intermedia y un 34,9% resistentes.

En un estudio realizado en *E.coli* aislados de orina en pacientes extrahospitalarios, todas las cepas fueron resistentes a cefotaxima (Rodríguez-Baño and Pascual 2004)

En nuestro estudio un 52,9% de los aislados fueron sensibles a **Ceftazidima**, un 1,6% con sensibilidad intermedia y un 45,5% resistentes.

En un estudio realizado sobre *E.coli* aislados de orina en pacientes extrahospitalarios, todas las cepas fueron resistentes a ceftazidima (Rodríguez-Baño and Pascual 2004)

Winokur y cols en 1998 obtienen los siguientes porcentajes de sensibilidad en aislados de *E.coli* productores de BLEE como parte del proyecto SENTRY: Canadá (80,4%), Europa (63,4%), América latina (46,2%), USA (70,5%), Asia (59,8%). (Winokur, Cantón et al. 2001)

En relación con **Aztreonam**, un 50,7% de los aislados fueron sensibles, un 12,8% intermedia y un 36,5% resistentes, lo cual coincide con otras áreas geográficas (Europa y Asia).

Winokur y cols en 1998 obtienen los siguientes porcentajes de sensibilidad en aislados de *E.coli* productores de BLEE como parte del proyecto SENTRY: Canadá (86,3%), Europa (59,9%), América latina (32,9%), USA (69,9%), Asia (57,5%).

(Winokur, Cantón et al. 2001)

En cuanto a **Cefepima** un 77,2% de los aislados fueron sensibles, un 12,2% intermedios y un 10,6% resistentes.

Winokur y cols en 1998 obtienen los siguientes porcentajes de sensibilidad en aislados de *E.coli* productores de BLEE como parte del proyecto SENTRY: Canadá (94,1%), Europa (83,2%), América latina (59,0%), USA (94,6%), Asia (71,3%).

(Winokur, Cantón et al. 2001)

Ninguna cepa presento resistencia a **carbapenemes** (imipenem y ertapenem) lo que coincide con lo descrito por otros autores. (Valverde, Coque et al. 2004)

Hernández y cols en un estudio multicéntrico realizado en España en 170 aislados de *E.coli* en 2000 todas las cepas fueron sensibles a imipenem. (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005)

Betriu y cols, concluyen en un estudio realizado en 70 aislados de enterobacterias que ertapenem presenta una excelente actividad en contra de las enterobacterias. (Betriu, Salso et al. 2006)

En 1990 estudios realizados por Jacoby y cols en cepas de *E.coli* portadoras de BLEE obtienen que los carbapenemas son los antibióticos mas activos frente a estas cepas (Jacoby and Carreras 1990) .

Winokur y cols en 1998 obtienen que un 0,6% de las cepas estudiadas fueron resistentes a imipenem en *E.coli* productores de BLEE como parte del proyecto SENTRY (Winokur, Cantón et al. 2001)

Otro estudio realizado en Corea en 307 *E.coli* aislados de orina y sangre no encuentran ninguna cepa resistente a imipenem. (Ko, Suh et al. 2007)

6. Resistencias asociadas

En relación a la resistencia asociada con **Gentamicina**, en nuestro estudio el 18% de las cepas productoras de BLEE fueron resistentes a gentamicina, lo cual es

inferior al obtenido por otros autores.

Hernández y cols en un estudio multicéntrico realizado en España en 170 aislados de *E.coli* en 2000 obtienen un 34% de cepas resistentes a gentamicina (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005)

Morosini y cols en 285 cepas de enterobacterias (172 cepas de *E.coli*) productoras de BLEE recolectadas entre 1989-2003, obtienen unas tasas de resistencias de un 27,4%. (Morosini, García-Castillo et al. 2006)

Winokur y cols en 1998 obtienen los siguientes porcentajes de resistencia en aislados de *E.coli* productoras de BLEE como parte del proyecto SENTRY frente a gentamicina: Canadá un 15,7%, Europa 25,7, América latina un 57,8%, USA un 21,1% y en Asia un 75,9. (Winokur, Cantón et al. 2001)

En un estudio realizado en Italia en 1999, en aislados de enterobacterias productoras de BLEE, de pacientes hospitalizados obtuvieron un 56% de cepas resistentes a gentamicina (Spanu, Luzzaro et al. 2002)

Wiener y cols en 15 aislados de *E.coli* de pacientes de asilos obtienen un 100% de cepas resistentes (Wiener, Quinn et al. 1999).

En relación a la resistencia a **fluoroquinolonas** nosotros hemos encontrado un 82,6 % de cepas resistentes a ciprofloxacino.

Hernández y cols en un estudio multicéntrico realizado en España en 2000, tanto en pacientes hospitalizados como extrahospitalarios, obtienen que el 62,5% de las cepas de *E.coli* productoras de BLEE presentaban resistencia a ciprofloxacino. (Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005).

Otros autores han obtenido tasas de un 62,5% de resistencia en aislados de pacientes comunitarios frente a fluoroquinolonas y un 41,6% en pacientes hospitalarios. (Valverde, Coque et al. 2004).

Spanu y cols en Italia obtienen tasas de un 58% de resistencia a ciprofloxacino en un estudio multicéntrico realizado en pacientes hospitalizados (Spanu, Luzzaro et al. 2002).

Tolun y cols en un estudio realizado en 2001 en 258 cepas de *E.coli* procedentes

de orina de pacientes comunitarios obtienen que un 5,1% de las cepas resistentes a ciprofloxacino son productoras de BLEE, por el contrario ninguna cepa sensible a ciprofloxacino fue portadora de BLEE (Tolun, Kucukbasmaci et al. 2004)

Wiener y cols en 15 aislados de *E.coli* de pacientes de asilos obtienen un 41% de cepas resistentes (Wiener, Quinn et al. 1999).

Morosini y cols en 285 cepas de enterobacterias (172 cepas de *E.coli*) productoras de BLEE recolectadas entre 1989-2003, obtienen unas tasas de resistencias a ciprofloxacino de un 37,2%. Entre los aislamientos productores de CTX-M-9 el 52,45% de las cepas fueron resistentes a ciprofloxacino. En el caso de las BLEE tipo SHV fue el 26,1%, en el caso de las BLEE tipo TEM el 28,9% (Morosini, García-Castillo et al. 2006)

De Cueto y cols, obtienen un 67,8% de cepas resistentes en un estudio realizado sobre 290 *E.coli*. (de Cueto, Hernández et al. 2006)

En relación a los porcentajes de resistencia obtenidos en función del tipo de BLEE se obtienen los siguientes resultados: para CMI >2 $\mu\text{g/ml}$ 84%, 100% y 74% para TEM, SHV y CTX-M respectivamente, la resistencia no fue significativamente mayor en ningún tipo de BLEE.

Otro estudio realizado en Corea en 307 *E.coli* aislados de orina y sangre encuentran un 30,3% de cepas resistentes. (Ko, Suh et al. 2007)

En cuanto al **mecanismo de resistencia a quinolonas**, en 1998 se describió una cepa de *K. pneumoniae* con un plásmido que contiene el gen *qnrA* (Martínez-Martínez and Pascual 1998) implicado en resistencia de bajo nivel a quinolonas por un mecanismo de protección de la diana. Este hallazgo ofreció una nueva explicación a la coresistencia entre betalactámicos y quinolonas en enterobacterias. Desde entonces se han descrito cepas productoras de BLEE y *qnrA* en múltiples localizaciones geográficas.

El gen *qnr B* se descubrió también en *K. pneumoniae* productora de CTX-M-15. Nosotros hemos encontrado *qnrB19* asociado a SHV-12 como ya ha sido descrito en USA (Jacoby, Walsh et al. 2006) también en *E.coli* y en otras enterobacterias.

Al evaluar la presencia de genes *qnr* en cepas productoras de BLEE encontramos un 4,7% en Kuwait (Cattoir, Poirel et al. 2007), un 4,9% en Barcelona (Lavilla, González-López et al. 2008), siendo 14 *qnr A* y 1 *qnr S* ninguna cepa tenía *qnr B*, solo 2 cepas eran *E.coli*. Dos *E.coli* de 27 productores de BLEE albergaban *qnr* en Corea (Song, Lee et al. 2009).

Al estudiar la presencia de los genes *qnr* en aislados resistentes a quinolonas, en China encuentran un 7,5% en *E.coli* de pacientes pediátricos (Wang, Yang et al. 2008), en Shanghai un 7,7% en *E.coli* resistente a ciprofloxacino procedente de hospitales (Wang, Tran et al. 2003), en Brasil solo un aislado entre 144 (Pereira, Andrade et al. 2007). En Francia encuentran un solo *E.coli* con *qnr* entre 297 resistentes a ácido nalidíxico (Mammeri, Van De Loo et al. 2005).

La cepa 163 fue positiva para el gen *qnr B* que codifica la proteína *qnr B19*, presento una CMI de 16 µg/ml de ciprofloxacino, como la resistencia a fluoroquinolonas en enterobacterias es fundamentalmente debida a mutaciones en las regiones del cromosoma QRDRs que median las dianas DNA girasa y topoisomerasa IV, amplificamos y secuenciamos *gyr A* y *parC* encontrando en *gyr A* dos mutaciones, una en la posición 83 que cambia Ser por Leu que ya ha sido descrita (Lindgren 2003) y otra en la posición 87 Asp por Asn. En *parC* encontramos una mutación en la posición 80 Ser por Ile también descrita en *E.coli* resistente a fluoroquinolonas. Doble mutación en las posiciones 83 y 87 de *gyr A* y alteraciones en Ser80/Glu87 de *parC* son frecuentes en aislados de *E.coli* resistentes a fluoroquinolonas (Chenia, Pillay et al. 2006)

En cuanto a **Fosfomicina**, el 5,7% de las cepas productoras de BLEE fueron resistentes a este antibiótico en nuestro estudio.

De Cueto y cols, obtienen un 0,3% de cepas resistentes en un estudio realizado sobre 290 *E.coli* y concluyen que fosfomicina mantiene su actividad frente a cepas productoras de BLEE y no presenta resistencia cruzada con otros grupos de antimicrobianos. (de Cueto, Hernández et al. 2006)

Otro estudio realizado en Corea en 307 *E.coli* aislados de orina y sangre

encuentran que todos los aislados fueron sensibles excepto uno. (Ko, Suh et al. 2007)

En cuanto a **Nitrofurantoína**, el 14,8% % de las cepas productoras de BLEE fueron resistentes a este antibiótico en nuestro estudio.

Estudios realizados en Canadá y USA obtienen tasa de resistencia de un 1,1 % en 1142 aislados de *E.coli* en ITUs procedentes de la comunidad. (Zhanel, Hisanaga et al. 2006)

En Francia, obtienen resultados similares ya que un 1,8% de aislados *E.coli* de orina fueron resistentes a Nitrofurantoína en 2005. (Honderlick, Cahen et al. 2006)

Sin embargo, otros autores encuentran tasas de un 28,7% de cepas resistentes entre *E.coli* productoras de BLEE. (Puerto, Fernández et al. 2006)

En hospitales de América latina se han descrito tasa de un 13% (Gales, Sader et al. 2002) y en Italia de un 20%. (Fadda, Nicoletti et al. 2005)

En cuanto a **SXT** obtuvimos un 58% de cepas productoras de BLEE resistentes a cotrimoxazol.

Wiener y cols en 15 aislados de *E.coli* de pacientes de asilos obtienen un 96% de cepas resistentes (Wiener, Quinn et al. 1999).

Winokur y cols en 1998 obtienen los siguientes porcentajes de resistencia en aislados de *E.coli* productoras de BLEE como parte del proyecto SENTRY frente a SXT: Canadá un 5,9%, Europa 8,9, América latina un 19,7%, USA un 6% y en Asia un 26,4%.

Morosini y cols en 285 cepas de enterobacterias (172 cepas de *E.coli*) productoras de BLEE recolectadas entre 1989-2003, obtienen unas tasas de resistencias de un 52,3%. (Morosini, García-Castillo et al. 2006)

Valverde y cols obtienen un 50% de cepas resistentes en 2003 (Valverde, Coque et al. 2004)

Hernández y cols en un estudio multicéntrico realizado en España en 170 aislados de *E.coli* en 2000 obtienen un 75% de cepas resistentes a cotrimoxazol

(Hernández, Martínez-Martínez et al. 2005)

De Cueto y cols, obtienen un 67,5% de cepas resistentes en un estudio realizado sobre 290 *E.coli*. (de Cueto, Hernández et al. 2006)

Otro estudio realizado en Corea en 307 *E.coli* aislados de orina y sangre encuentran un 43.0% de cepas resistentes. (Ko, Suh et al. 2007)

Ninguna cepa presento resistencia a **tigeciclina**, un 0,5% presentaron sensibilidad intermedia.

En un estudio realizado en 285 aislados de enterobacterias de pacientes hospitalizados y de la comunidad obtienen un 97,5% de cepas sensibles a tigeciclina. (Garau 2008)

Hope y cols, en 417 aislados de *E.coli* un 99% de las cepas fueron sensibles a tigeciclina. (Hope, Warner et al. 2006) (Morosini, García-Castillo et al. 2006)

Comparación de las resistencias con un grupo control

En el grupo control de nuestro trabajo obtuvimos los siguientes porcentajes de resistencia en **cepas no productoras de BLEE**: Fosfomicina 3.7%, SXT 39.1%, Nitrofurantoína 2.1% y Ciprofloxacino 29.6%. Cuando comparamos estos porcentajes con los *E.coli* aislados de orina de un estudio español (Andréu, Alos et al. 2005) (Fosfomicina 2.1%, SXT 33.9%, Nitrofurantoína 5.7% y Ciprofloxacino 22.8%) y un estudio europeo (Kahlmeter 2003) (Fosfomicina 0.5%, SXT 25.7%, Nitrofurantoína 4.2% y Ciprofloxacino 14.7%) encontramos que nosotros tenemos en conjunto algo mas elevados nuestros porcentajes de resistencia excepto para Nitrofurantoína, posiblemente porque nuestros aislados incluyen cepas del hospital, pero las diferencias no son significativas. El porcentaje de resistencia obtenido para SXT y ciprofloxacino las desaconseja como terapia empírica.

La relación entre **producción de BLEE** y resistencia a antibióticos de otras familias esta ampliamente recogida (Paterson and Bonomo 2005). En nuestro estudio hemos obtenido una relación estadísticamente significativa entre producción de BLEE y resistencia a todos los antibióticos estudiados excepto a fosfomicina. También obtienen una diferencia estadísticamente significativa para

ciprofloxacino y gentamicina Alhambra y cols. (Alhambra, Cuadros et al. 2004)

Otros trabajos (Baquero, Cercenado et al. 2006) (Schwaber, Navon-Venezia et al. 2005) que comparan directamente las tasas de resistencia de cepas que producen y no producen BLEE, confirman la idea que las cepas productoras son más resistentes a diversos grupos de antimicrobianos. Por ejemplo, en el estudio SMART de España (Baquero, Cercenado et al. 2006) frente a ciprofloxacino son resistentes un 60,5% de los *E.coli* productores de BLEE y un 20,4% de los no productores de BLEE, en nuestro trabajo la diferencia es entre el 82,6% y el 29,6%, aun más evidente, aunque igualmente significativa.

Conclusiones

- 1) La prevalencia de *E.coli* productores de BLEE entre los aislados de urocultivos en nuestro laboratorio durante 2005 fue del 3,7%, equivalente al publicado por otros autores en nuestra área geográfica.
- 2) La aplicación de los puntos de corte del CLSI califico erróneamente como sensibles a cefotaxima el 48% de las cepas y a ceftazidima el 53%. Si tomamos como punto de corte una CMI $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ el porcentaje se reduce a 6% y 1,5% respectivamente. Es necesario mantener la alarma de BLEE en una CMI $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ y determinar simultáneamente ambas cefalosporinas. La utilización de aztreonam y cefepima no proporciona mejores resultados, ya que aplicando los puntos de corte del CLSI un 51% y un 77 % de las cepas serian calificadas erróneamente utilizando estos antibióticos respectivamente.
- 3) Con independencia del valor de CMI para cefotaxima y ceftazidima todos los aislamientos mostraron un halo de inhibición ampliado en la prueba de sinergia de doble disco, colocado a 20mm, siguiendo las indicaciones de Jarlier y cols.
- 4) El confirmatorio de producción de BLEE, según el CLSI, fue positivo en el 100% de los casos para cefotaxima/clavulánico, mientras que para ceftazidima/clavulánico lo fue en el 62,4%. Por tanto, aconsejamos incluir cefotaxima-clavulánico en los paneles de determinación de sensibilidad. Otra alternativa seria incluir aztreonam-clavulanico.
- 5) El análisis de los fenotipos de resistencia a betalactámicos, debido a las asociaciones con betalactamasas de amplio espectro, entre diferentes tipos de BLEE y con otros mecanismos, es de una gran complejidad y no permite inferir el tipo de BLEE implicado.
- 6) La BLEE del tipo CTX-M fue la más prevalente, 48%, de las cuales 52% pertenecían al grupo CTX-M grupo 9, el más prevalente en nuestro país. Se secuenciaron seis cepas de esta familia que han resultado ser CTX-M-14 en cinco casos y en un caso CTX-M-9, las dos representan el 91% de las BLEE de

- este tipo aisladas en diferentes regiones de España.
- 7) Las BLEE del tipo CTX-M pertenecientes a otras familias, analizadas, han resultado ser CTX-M-15 y CTX-M-1. Asociadas a TEM, incluso siendo TEM-1, dieron las CMI's más elevadas de cefotaxima y ceftazidima.
 - 8) Las cepas productoras de BLEE tipo TEM, 25%, mostraron un amplio rango de CMI's de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima, lo que indica gran variedad en sus perfiles hidrolíticos. Hay diferencias notables en el nivel de resistencia a estos antibióticos.
 - 9) El tipo SHV, 13%, hidroliza preferentemente ceftazidima y aztreonam, cuando se asocia con TEM la resistencia es del 100%. Cefotaxima y cefepima se afectan muy poco y las CMI's tienen la moda en 2 y 0,5 µg/ml respectivamente.
 - 10) Al comparar las resistencias obtenidas en nuestros *E.coli* productores de BLEE con las del grupo control, no productores, hemos encontrado un aumento significativo en la resistencia a gentamicina, ciprofloxacino, Nitrofurantoina y SXT, no lo ha sido a fosfomicina. Es decir, las cepas productoras de BLEE son más resistentes a otras familias de antimicrobianos. El más llamativo es la resistencia a ciprofloxacino que paso del 82,6% al 29,6%.
 - 11) La prevalencia de resistencia a ciprofloxacino mediada por los genes *qnr* es muy baja en nuestra población. La cepa positiva produce *qnr* B-19 y SHV-12 presenta mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, responsables de su nivel de resistencia.
 - 12) La mayoría de nuestros pacientes procedían de la comunidad. La media de edad fue de 68,5 años, con un rango de 31-106 años. Un 65% de los pacientes fueron mujeres. Es en el rango de los 80-90 años donde se encuentra el mayor porcentaje de mujeres y hombres procedentes de la comunidad. El aislamiento en el ambiente hospitalario de estas cepas ya no está confinado a los servicios clásicos como la UCI sino que pueden aparecer en cualquier servicio del hospital.
 - 13) La diversidad genética entre las cepas productoras de BLEE fue muy elevada

no encontrándose evidencia de diseminación clonal.

- 14) Fosfomicina y Nitrofurantoína son opciones para el tratamiento de las cistitis no complicadas en la comunidad. Imipenem y ertapenem son muy activos pero deben reservarse para las ITUs complicadas. Tigeciclina que es muy activa frente a cepas productoras de BLEE, su actividad en ITU debe ser evaluada.

Referencias bibliográficas

- Albertini, M. T., C. Benoit, et al. (2002). "Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study." J Hosp Infect **52**(2): 107-13.
- Alhambra, A., J. A. Cuadros, et al. (2004). "In vitro susceptibility of recent antibiotic-resistant urinary pathogens to ertapenem and 12 other antibiotics." J Antimicrob Chemother **53**(6): 1090-4.
- Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **289**(1036): 321-31.
- Ambler, R. P., A. F. Coulson, et al. (1991). "A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases." Biochem J **276** (Pt 1): 269-70.
- Andreu, A., J. I. Alos, et al. (2005). "[Etiology and antimicrobial susceptibility among uropathogens causing community-acquired lower urinary tract infections: a nationwide surveillance study]." Enferm Infecc Microbiol Clin **23**(1): 4-9.
- Arlet, G., M. Rouveau, et al. (1991). "Novel transferable extended-spectrum beta-lactamase (SHV-6) from *Klebsiella pneumoniae* conferring selective resistance to ceftazidime." FEMS Microbiol Lett **65**(1): 57-62.
- Arlet, G., M. Rouveau, et al. (1997). "Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum beta-lactamase." FEMS Microbiol Lett **152**(1): 163-7.
- Arpin, C., L. Coulange, et al. (2007). "Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains in various types of private health care centers." Antimicrob Agents Chemother **51**(9): 3440-4.
- Arpin, C., V. Dubois, et al. (2005). "Clinical and molecular analysis of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing enterobacteria in the community setting." J Clin Microbiol **43**(10): 5048-54.
- Arpin, C., R. Labia, et al. (2001). "SHV-16, a beta-lactamase with a pentapeptide duplication in the omega loop." Antimicrob Agents Chemother **45**(9): 2480-5.
- Aubron, C., L. Pore, et al. (2005). "Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers." Emerg Infect Dis **11**(2): 260-4.
- Baquero, F., E. Cercenado, et al. (2006). "[Patterns of susceptibility to antibiotics of Enterobacteriaceae causing intra-abdominal infection in Spain: SMART 2003 study outcomes]." Rev Esp Quimioter **19**(1): 51-9.
- Barnaud, G., G. Arlet, et al. (1998). "Salmonella enteritidis: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*." Antimicrob Agents Chemother **42**(9): 2352-8.
- Barthelemy, M., J. Peduzzi, et al. (1988). "Single amino acid substitution between SHV-1 beta-lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme." FEBS Lett **231**(1): 217-20.

- Bauernfeind, A., Y. Chong, et al. (1989). "Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins." Infection **17**(5): 316-21.
- Bauernfeind, A., H. Grimm, et al. (1990). "A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*." Infection **18**(5): 294-8.
- Bauernfeind, A., I. Stemplinger, et al. (1996). "Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase." Antimicrob Agents Chemother **40**(3): 616-20.
- Betriu, C., S. Salso, et al. (2006). "Comparative in vitro activity and the inoculum effect of ertapenem against Enterobacteriaceae resistant to extended-spectrum cephalosporins." Int J Antimicrob Agents **28**(1): 1-5.
- Blazquez, J., M. I. Morosini, et al. (1995). "Single amino acid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **39**(1): 145-9.
- Bobrowski, M. M., M. Matthew, et al. (1976). "Plasmid-determined beta-lactamase indistinguishable from the chromosomal beta-lactamase of *Escherichia coli*." J Bacteriol **125**(1): 149-57.
- Bonnet, R. (2004). "Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 1-14.
- Bonnet, R., J. L. Sampaio, et al. (2000). "A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil." Antimicrob Agents Chemother **44**(11): 3061-8.
- Bou, G., M. Cartelle, et al. (2002). "Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain." J Clin Microbiol **40**(11): 4030-6.
- Bradford, P. A. (2001). "Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat." Clin Microbiol Rev **14**(4): 933-51, table of contents.
- Bradford, P. A., C. Urban, et al. (1995). "SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients." Antimicrob Agents Chemother **39**(4): 899-905.
- Brinas, L., M. A. Moreno, et al. (2005). "Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003." Antimicrob Agents Chemother **49**(3): 1262-4.
- Brown, D. F. and L. Brown (1991). "Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity." J Antimicrob Chemother **27**(2): 185-90.
- Bure, A., P. Legrand, et al. (1988). "Dissemination in five French hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **7**(6): 780-2.
- Bush, K. (1988). "Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic." Clin Microbiol Rev **1**(1): 109-23.

- Bush, K. (1989). "Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4." Antimicrob Agents Chemother **33**(3): 271-6.
- Bush, K. (1989). "Characterization of beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **33**(3): 259-63.
- Bush, K., G. A. Jacoby, et al. (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrob Agents Chemother **39**(6): 1211-33.
- Calbo, E., V. Romani, et al. (2006). "Risk factors for community-onset urinary tract infections due to Escherichia coli harbouring extended-spectrum beta-lactamases." J Antimicrob Chemother **57**(4): 780-3.
- Canton, R., A. Novais, et al. (2008). "Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 144-53.
- Cartelle, M., M. del Mar Tomas, et al. (2004). "High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 2308-13.
- Cattoir, V., L. Poirel, et al. (2007). "Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates." J Antimicrob Chemother **60**(2): 394-7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, W., PA. CLSI document. Clinical and Laboratory Standard Methods. (2007). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement; p.M100-S17."
- CLSI (2007). "Clinical and Laboratory Standards Institute. Screening and Confirmatory Tests for ESBLs in Escherichia coli. CLSI. Table 2A Enterobacteriaceae M7-MIC." **27**(1): 102.
- Colodner, R. (2005). "Extended-spectrum beta-lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists." Am J Infect Control **33**(2): 104-7.
- Colodner, R., Y. Keness, et al. (2001). "Antimicrobial susceptibility of community-acquired uropathogens in northern Israel." Int J Antimicrob Agents **18**(2): 189-92.
- Collatz, E., R. Labia, et al. (1990). "Molecular evolution of ubiquitous beta-lactamases towards extended-spectrum enzymes active against newer beta-lactam antibiotics." Mol Microbiol **4**(10): 1615-20.
- Cormican, M., D. Morris, et al. (1998). "Extended spectrum beta-lactamase production and fluorquinolone resistance in pathogens associated with community acquired urinary tract infection." Diagn Microbiol Infect Dis **32**(4): 317-9.
- Chaibi, E. B., S. Farzaneh, et al. (1996). "Problems encountered in the characterization of IRT beta-lactamase-producing clinical Escherichia coli isolates intermediate-resistant to cephalothin." J Antimicrob Chemother

- 37(1): 190-1.
- Chaibi, E. B., S. Farzaneh, et al. (1996). "An additional ionic bond suggested by molecular modelling of TEM-2 might induce a slight discrepancy between catalytic properties of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases." FEMS Microbiol Lett **143**(2-3): 121-5.
- Chaibi, E. B., D. Sirot, et al. (1999). "Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics." J Antimicrob Chemother **43**(4): 447-58.
- Chanawong, A., F. H. M'Zali, et al. (2000). "Characterisation of extended-spectrum beta-lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)." FEMS Microbiol Lett **184**(1): 85-9.
- Chanawong, A., F. H. M'Zali, et al. (2002). "Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China." Antimicrob Agents Chemother **46**(3): 630-7.
- Chenia, H. Y., B. Pillay, et al. (2006). "Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens." J Antimicrob Chemother **58**(6): 1274-8.
- Danel, F., L. M. Hall, et al. (1999). "OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **43**(6): 1362-6.
- de Cueto, M., J. R. Hernandez, et al. (2006). "[Activity of fosfomicin against extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*]." Enferm Infecc Microbiol Clin **24**(10): 613-6.
- De Champs, C., D. Sirot, et al. (2000). "A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in France. The French Study Group." Antimicrob Agents Chemother **44**(11): 3177-9.
- Du Bois, S. K., M. S. Marriott, et al. (1995). "TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function." J Antimicrob Chemother **35**(1): 7-22.
- Dubois, V., L. Poirel, et al. (2004). "SHV-49, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*." Antimicrob Agents Chemother **48**(11): 4466-9.
- Empel, J., A. Baraniak, et al. (2008). "Molecular survey of {beta}-lactamases conferring resistance to newer generation {beta}-lactams in Enterobacteriaceae in Polish hospitals." Antimicrob Agents Chemother.
- Fadda, G., G. Nicoletti, et al. (2005). "Antimicrobial susceptibility patterns of contemporary pathogens from uncomplicated urinary tract infections isolated in a multicenter Italian survey: possible impact on guidelines." J Chemother **17**(3): 251-7.
- Fortineau, N., L. Poirel, et al. (2001). "Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*." J Antimicrob

- Chemother **47**(2): 207-10.
- Frere, J. M. (1995). "Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics." Mol Microbiol **16**(3): 385-95.
- Frere, J. M., M. Galleni, et al. (2005). "Is it necessary to change the classification of {beta}-lactamases?" J Antimicrob Chemother **55**(6): 1051-3.
- Gales, A. C., H. S. Sader, et al. (2002). "Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000)." Diagn Microbiol Infect Dis **44**(3): 289-99.
- Garau, J. (2008). "Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum beta-lactamases: fosfomicin, nitrofurantoin and tigecycline." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 198-202.
- Gazouli, M., N. J. Legakis, et al. (1998). "Effect of substitution of Asn for Arg-276 in the cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase CTX-M-4." FEMS Microbiol Lett **169**(2): 289-93.
- Gazouli, M., E. Tzelepi, et al. (1998). "Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis." Antimicrob Agents Chemother **42**(5): 1259-62.
- Giakkoupi, P., L. S. Tzouveleki, et al. (2000). "IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain." Antimicrob Agents Chemother **44**(9): 2247-53.
- Girlich, D., L. Poirel, et al. (2001). "Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand." J Clin Microbiol **39**(1): 175-82.
- Gobernado, M. (2005). "[Extended-spectrum beta-lactamases on the rise.]" Rev Esp Quimioter **18**(2): 115-7.
- Goossens, H., S. Malhotra-Kumar, et al. (2004). "Results of two worldwide surveys into physician awareness and perceptions of extended-spectrum beta-lactamases." Clin Microbiol Infect **10**(8): 760-2.
- Gupta, V. (2007). "An update on newer beta-lactamases." Indian J Med Res **126**(5): 417-27.
- Gutmann, L., B. Ferre, et al. (1989). "SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams." Antimicrob Agents Chemother **33**(6): 951-6.
- Hawkey, P. M. (2008). "Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 159-65.
- Heritage, J., P. A. Chambers, et al. (2003). "SHV-34: an extended-spectrum beta-lactamase encoded by an epidemic plasmid." J Antimicrob Chemother **52**(6): 1015-7.
- Heritage, J., F. H. M'Zali, et al. (1999). "Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria." J Antimicrob Chemother **44**(3): 309-18.

- Hernandez, J. R., L. Martinez-Martinez, et al. (2005). "Nationwide study of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 2122-5.
- Hernandez, J. R., A. Pascual, et al. (2003). "[Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002)]." Enferm Infecc Microbiol Clin **21**(2): 77-82.
- Honderlick, P., P. Cahen, et al. (2006). "[Uncomplicated urinary tract infections, what about fosfomycin and nitrofurantoin in 2006?]." Pathol Biol (Paris) **54**(8-9): 462-6.
- Hope, R., M. Warner, et al. (2006). "Activity of tigecycline against ESBL-producing and AmpC-hyperproducing Enterobacteriaceae from south-east England." J Antimicrob Chemother **58**(6): 1312-4.
- Huang, W., J. Petrosino, et al. (1996). "Amino acid sequence determinants of beta-lactamase structure and activity." J Mol Biol **258**(4): 688-703.
- Huletsky, A., J. R. Knox, et al. (1993). "Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling." J Biol Chem **268**(5): 3690-7.
- Huovinen, P., S. Huovinen, et al. (1988). "Sequence of PSE-2 beta-lactamase." Antimicrob Agents Chemother **32**(1): 134-6.
- Huovinen, S. (1988). "Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated beta-lactamases with Pharmacia PhastSystem." Antimicrob Agents Chemother **32**(11): 1730-2.
- Jacoby, G. A. and K. Bush (2005). "Beta-lactamase nomenclature." J Clin Microbiol **43**(12): 6220.
- Jacoby, G. A. and I. Carreras (1990). "Activities of beta-lactam antibiotics against Escherichia coli strains producing extended-spectrum beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **34**(5): 858-62.
- Jacoby, G. A. and A. A. Medeiros (1991). "More extended-spectrum beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **35**(9): 1697-704.
- Jacoby, G. A. and L. S. Munoz-Price (2005). "The new beta-lactamases." N Engl J Med **352**(4): 380-91.
- Jacoby, G. A., K. E. Walsh, et al. (2006). "qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1178-82.
- Jarlier, V., M. H. Nicolas, et al. (1988). "Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns." Rev Infect Dis **10**(4): 867-78.
- Jaurin, B. and T. Grundstrom (1981). "ampC cephalosporinase of Escherichia coli K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(8): 4897-901.
- Joklik, W. K. (1996). "The story of penicillin: the view from Oxford in the early 1950s." FASEB J **10**(4): 525-8.

- Kahlmeter, G. (2003). "An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project." J Antimicrob Chemother **51**(1): 69-76.
- Kim, J., Y. M. Lim, et al. (2005). "Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Korea." Antimicrob Agents Chemother **49**(4): 1572-5.
- Knothe, H., P. Shah, et al. (1983). "Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*." Infection **11**(6): 315-7.
- Knox, J. R. (1995). "Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure." Antimicrob Agents Chemother **39**(12): 2593-601.
- Ko, K. S., J. Y. Suh, et al. (2007). "In vitro activity of fosfomicin against ciprofloxacin-resistant or extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from urine and blood." Diagn Microbiol Infect Dis **58**(1): 111-5.
- Lagace-Wiens, P. R., K. A. Nichol, et al. (2006). "Treatment of lower urinary tract infection caused by multidrug-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* with amoxicillin/clavulanate: case report and characterization of the isolate." J Antimicrob Chemother **57**(6): 1262-3.
- Lavilla, S., J. J. Gonzalez-López, et al. (2008). "Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain." J Antimicrob Chemother **61**(2): 291-5.
- Levesque, R. and P. H. Roy (1982). "Mapping of the plasmid (pLQ3) from *Achromobacter* and cloning of its cephalosporinase gene in *Escherichia coli*." Gene **18**(1): 69-75.
- Levison, M. E. (2002). "Plasmid-mediated Extended-spectrum beta-Lactamases in Organisms Other Than *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: A Hidden Reservoir of Transferable Resistance Genes." Curr Infect Dis Rep **4**(3): 181-183.
- Lindgren, P. K., A. Diamaid, A. (2003). "Mutation rate and evolution of fluoroquinolones resistance in *E.coli* isolates in patient with urinary tract infection." Ant.Agents Chemother **47**: 3222-3232.
- Livermore, D. and D. Brown (2001). "Detection of beta-lactamase-mediated resistance." Journal of antimicrobial Chemotherapy **48**, suppl: 59-64.
- Livermore, D. M. (1995). "beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." Clin Microbiol Rev **8**(4): 557-84.
- Livermore, D. M., R. Canton, et al. (2007). "CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe." J Antimicrob Chemother **59**(2): 165-74.
- Luzzaro, F., M. Mezzatesta, et al. (2006). "Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey." J Clin Microbiol **44**(5):

- 1659-64.
- Ma, L., J. Alba, et al. (2005). "Novel SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase, SHV-57, that confers resistance to ceftazidime but not ceftazolin." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 600-5.
- Machado, E., R. Canton, et al. (2005). "Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 1823-9.
- Mammeri, H., M. Van De Loo, et al. (2005). "Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 71-6.
- Mandell, G., B. JE, et al. (2005). "Principles and Practice of Infectious Diseases " **1**: 881-883.
- Mandell, G. L., J. E. Bennett, et al. (2005). "Principles and practice of infectious diseases." **2**: 2567-2586.
- Marin, M. and F. Gudiol (2003). "[beta-Lactam antibiotics]." Enferm Infecc Microbiol Clin **21**(1): 42-55.
- Martinez-Martinez, L. and A. J. Pascual, GA. (1998). "Quinolone resistance form a transferable plasmid." Lancet **351**: 797-799.
- Matthew, M., R. W. Hedges, et al. (1979). "Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria." J Bacteriol **138**(3): 657-62.
- McDonald, L. C., F. J. Chen, et al. (2001). "Emergence of reduced susceptibility and resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and contributions of distinct selective pressures." Antimicrob Agents Chemother **45**(11): 3084-91.
- Medeiros, A. A. (1997). "Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics." Clin Infect Dis **24 Suppl 1**: S19-45.
- Medeiros, A. A., M. Cohenford, et al. (1985). "Five novel plasmid-determined beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **27**(5): 715-9.
- Mensa, J. G., JM. Azanza, JR .Dominguez-Gil ,A. Garcia,JE. Jimenez de Anta,MT. Prats G (2008). "Guia de Terapeutica Antimicrobiana."
- Mirelis, B., A. Rivera, et al. (2006). "A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*." Enferm Infecc Microbiol Clin **24**(6): 370-2.
- Miro, E., M. del Cuerpo, et al. (1998). "Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction." J Antimicrob Chemother **42**(4): 535-8.
- Morosini, M. I., M. Garcia-Castillo, et al. (2006). "Antibiotic coresistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2695-9.
- Naas, T., L. Poirel, et al. (2008). "Minor extended-spectrum beta-lactamases." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 42-52.

- NCCLS (2000). "National Committee for clinical Laboratory standards. Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved standard ,5th edn. M2-A6.Wayne, Pa. ."
- NCCLS (2000). "National Committee for clinical Laboratory standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15 th edn. NCCLS Document M2-A7.Wayne, Pa."
- Nijssen, S., A. Florijn, et al. (2004). "Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates." Int J Antimicrob Agents **24**(6): 585-91.
- Nordmann, P. and T. Naas (1994). "Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **38**(1): 104-14.
- Nordmann, P. and L. Poirel (2002). "Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes." Clin Microbiol Infect **8**(6): 321-31.
- Nordmann, P., E. Ronco, et al. (1993). "Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **37**(5): 962-9.
- Nuesch-Inderbilen, M. T., H. Hachler, et al. (1995). "New system based on site-directed mutagenesis for highly accurate comparison of resistance levels conferred by SHV beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **39**(8): 1726-30.
- Nuesch-Inderbilen, M. T., F. H. Kayser, et al. (1997). "Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12." Antimicrob Agents Chemother **41**(5): 943-9.
- Olson, A. B., M. Silverman, et al. (2005). "Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 2112-5.
- Ouellette, M., L. Bissonnette, et al. (1987). "Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7378-82.
- Palzkill, T. and D. Botstein (1992). "Identification of amino acid substitutions that alter the substrate specificity of TEM-1 beta-lactamase." J Bacteriol **174**(16): 5237-43.
- Papanicolaou, G. A., A. A. Medeiros, et al. (1990). "Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*." Antimicrob Agents Chemother **34**(11): 2200-9.
- Paterson, D. L. (2000). "Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)." Clin Microbiol Infect **6**(9): 460-3.
- Paterson, D. L. and R. A. Bonomo (2005). "Extended-spectrum beta-lactamases: a

- clinical update." Clin Microbiol Rev **18**(4): 657-86.
- Paterson, D. L., F. Rossi, et al. (2005). "In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART)." J Antimicrob Chemother **55**(6): 965-73.
- Patterson, J. E. (2003). "Extended-spectrum beta-lactamases." Semin Respir Crit Care Med **24**(1): 79-88.
- Pereira, A. S., S. S. Andrade, et al. (2007). "Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of qnr gene in Escherichia coli resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals." Braz J Infect Dis **11**(1): 40-3.
- Perez, F., A. Endimiani, et al. (2007). "The continuing challenge of ESBLs." Curr Opin Pharmacol **7**(5): 459-69.
- Perilli, M., C. Mugnaioli, et al. (2005). "Novel TEM-type extended-spectrum beta-lactamase, TEM-134, in a Citrobacter koseri clinical isolate." Antimicrob Agents Chemother **49**(4): 1564-6.
- Peterson, L. R. (2008). "Antibiotic policy and prescribing strategies for therapy of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: the role of piperacillin-tazobactam." Clin Microbiol Infect **14** Suppl 1: 181-4.
- Philippon, A., G. Arlet, et al. (2002). "Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **46**(1): 1-11.
- Philippon, A., R. Labia, et al. (1989). "Extended-spectrum beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **33**(8): 1131-6.
- Pitout, J. D., P. Nordmann, et al. (2005). "Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community." J Antimicrob Chemother **56**(1): 52-9.
- Poirel, L., V. Cattoir, et al. (2008). "Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?" Clin Microbiol Infect **14**(4): 295-7.
- Poirel, L., M. Gniadkowski, et al. (2002). "Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3." J Antimicrob Chemother **50**(6): 1031-4.
- Poirel, L., C. Heritier, et al. (2004). "Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 15-22.
- Poirel, L., T. Naas, et al. (1999). "Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an Escherichia coli integron gene." Antimicrob Agents Chemother **43**(3): 573-81.
- Poirel, L., T. Naas, et al. (2001). "CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop." Antimicrob Agents Chemother **45**(12): 3355-61.

- Prinarakis, E. E., V. Miriagou, et al. (1997). "Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant." Antimicrob Agents Chemother **41**(4): 838-40.
- Prinarakis, E. E., E. Tzelepi, et al. (1996). "Characterization of a novel SHV beta-lactamase variant that resembles the SHV-5 enzyme." FEMS Microbiol Lett **139**(2-3): 229-34.
- Puerto, A. S., J. G. Fernandez, et al. (2006). "In vitro activity of beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics in extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates of Escherichia coli." Diagn Microbiol Infect Dis **54**(2): 135-9.
- Rasheed, J. K., C. Jay, et al. (1997). "Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of Escherichia coli during multiple episodes of bacteremia." Antimicrob Agents Chemother **41**(3): 647-53.
- Rodriguez-Bano, J., M. D. Navarro, et al. (2004). "Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in nonhospitalized patients." J Clin Microbiol **42**(3): 1089-94.
- Rodriguez-Bano, J., M. D. Navarro, et al. (2006). "Bacteremia due to extended-spectrum beta -lactamase-producing Escherichia coli in the CTX-M era: a new clinical challenge." Clin Infect Dis **43**(11): 1407-14.
- Rodriguez-Bano, J. and A. Pascual (2004). "[Multiresistant bacteria, nosocomially or community acquired?]." Enferm Infecc Microbiol Clin **22**(9): 505-6.
- Rodriguez-Bano, J. and D. L. Paterson (2006). "A change in the epidemiology of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms." Clin Infect Dis **42**(7): 935-7.
- Rodriguez-Baño, j. N., md. (2007). "Impact of ESBL on empirical therapy and antibiotic policies." Enferm Infecc Microbiol Clin **25** supl: 54-9.
- Rodriguez, M. M., P. Power, et al. (2004). "Chromosome-encoded CTX-M-3 from Kluyvera ascorbata: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases." Antimicrob Agents Chemother **48**(12): 4895-7.
- Romero, L., L. Lopez, et al. (2005). "Long-term study of the frequency of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates producing extended-spectrum beta-lactamases." Clin Microbiol Infect **11**(8): 625-31.
- Rossolini, G. M., M. M. D'Andrea, et al. (2008). "The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases." Clin Microbiol Infect **14** Suppl 1: 33-41.
- Sabate, M., R. Tarrago, et al. (2000). "Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from Escherichia coli in Spain." Antimicrob Agents Chemother **44**(7): 1970-3.
- Saino, Y., M. Inoue, et al. (1984). "Purification and properties of an inducible cephalosporinase from Pseudomonas maltophilia GN12873." Antimicrob Agents Chemother **25**(3): 362-5.
- Sawai, T., M. Kanno, et al. (1982). "Characterization of eight beta-lactamases of

- Gram-negative bacteria." J Bacteriol **152**(2): 567-71.
- Schwaber, M. J., S. Navon-Venezia, et al. (2005). "High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 2137-9.
- Sirot, D., J. Sirot, et al. (1987). "Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase." J Antimicrob Chemother **20**(3): 323-34.
- Song, S., E. Y. Lee, et al. (2009). "Antibiotic Resistance Mechanisms of *Escherichia coli* Isolates from Urinary Specimens." Korean J Lab Med **29**(1): 17-24.
- Sowek, J. A., S. B. Singer, et al. (1991). "Substitution of lysine at position 104 or 240 of TEM-1pTZ18R beta-lactamase enhances the effect of serine-164 substitution on hydrolysis or affinity for cephalosporins and the monobactam aztreonam." Biochemistry **30**(13): 3179-88.
- Spanu, T., F. Luzzaro, et al. (2002). "Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs." Antimicrob Agents Chemother **46**(1): 196-202.
- Susic, E. (2004). "[Mechanisms of resistance in Enterobacteriaceae towards beta-lactamase antibiotics]." Acta Med Croatica **58**(4): 307-12.
- Toleman, M. A., K. Rolston, et al. (2004). "blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 329-32.
- Tolun, V., O. Kucukbasmaci, et al. (2004). "Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains." Clin Microbiol Infect **10**(1): 72-5.
- Tzouvelekis, L. S. and R. A. Bonomo (1999). "SHV-type beta-lactamases." Curr Pharm Des **5**(11): 847-64.
- Vahaboglu, H., F. Coskuncan, et al. (2001). "Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains." J Med Microbiol **50**(7): 642-5.
- Valverde, A., T. M. Coque, et al. (2004). "Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain." J Clin Microbiol **42**(10): 4769-75.
- Vila, J., M. Navia, et al. (1997). "Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob Agents Chemother **41**(12): 2757-9.
- Villegas, M. V., J. N. Kattan, et al. (2008). "Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America." Clin Microbiol Infect **14** Suppl 1: 154-8.
- Walther-Rasmussen, J. and N. Hoiby (2004). "Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases." Can J Microbiol **50**(3): 137-65.

- Wang, A., Y. Yang, et al. (2008). "Presence of qnr gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China." BMC Infect Dis **8**: 68.
- Wang, M., J. H. Tran, et al. (2003). "Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China." Antimicrob Agents Chemother **47**(7): 2242-8.
- Webb, E. C. (1993). "Enzyme nomenclature: a personal retrospective." FASEB J **7**(12): 1192-4.
- Weldhagen, G. F., L. Poirel, et al. (2003). "Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2385-92.
- Wiener, J., J. P. Quinn, et al. (1999). "Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes." JAMA **281**(6): 517-23.
- Winokur, P. L., R. Canton, et al. (2001). "Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region." Clin Infect Dis **32** Suppl 2: S94-103.
- Wu, P. J., K. Shannon, et al. (1995). "Mechanisms of hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase by clinical isolates of *Escherichia coli*." J Antimicrob Chemother **36**(6): 927-39.
- Yuan, M., H. Aucken, et al. (1998). "Epidemiological typing of *klebsiellae* with extended-spectrum beta-lactamases from European intensive care units." J Antimicrob Chemother **41**(5): 527-39.
- Zhanel, G. G., T. L. Hisanaga, et al. (2006). "Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA)." Int J Antimicrob Agents **27**(6): 468-75.

Addendum

Hasta el momento de este trabajo han salido las siguientes publicaciones:

- 1) Extended-Spectrum beta-lactamase (ESBL) *E.coli* Producers: An Therapeutic Problem in Urinary Tract Infections in Hospitalized and non-hospitalized Patients. ICCAC 2006
- 2) In vitro activity of Tigecycline and antimicrobial agents against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) *E.coli* producers. ECCMID Munich- 2006
- 3) Revisando el pasado : actividad in vitro de Fosfomicina y Nitrofurantoína y otros 17 antimicrobianos frente a 192 cepas *E. coli*, aislados de urocultivo productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) SEIMC 2007
- 4) Study of Fluoroquinolone Resistance Mechanisms among Extended -Spectrum betalactamase (ESBL) - Producing *E. coli* Urinary Isolates in Madrid, Spain. ECCMID Finlandia-2009
- 5) *Escherichia coli* productores de BLEE tipo SHV: resistencias asociadas. SEIMC Sevilla- 2009